

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS OCAS
CULTIVADAS (*Oxalis tuberosa* Mol.) DE LA REGIÓN CAJAMARCA”**

Presentado por:

Elena Núñez Linares

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima-Perú

2015

INDICE

	RESUMEN	
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	2.1. Familia <i>Oxalidaceae</i> y género <i>Oxalis</i>	3
	2.2. Origen de la oca	3
	2.2.1. Taxonomía de oca	4
	2.3. Descripción botánica	5
	2.4. Ciclo celular y ploidía	7
	2.5. Usos de la oca	8
	2.6. Diversidad Genética	9
	2.6.1. Concepto de Diversidad	9
	2.6.2. Caracterización Morfológica de la oca	10
	2.6.3. Marcadores Moleculares	11
	2.6.4. AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	12
	2.6.5. Análisis moleculares en oca	13
	2.7. Departamento de Cajamarca	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
	3.1. Campo experimental	18
	3.1.1. Ubicación	18
	3.2. Material Vegetal	18
	3.3. Metodología	23
	3.3.1. Caracterización morfológica	23
	3.3.2. Caracterización Molecular	24
	3.4. Análisis estadístico	34
	3.4.1. Análisis de datos	34
	3.4.2. Caracterización Molecular	34
	3.4.3. Caracterización Morfológica	36
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
	4.1. Caracterización morfológica	37
	4.1.1. Descriptores morfológicos cuantitativos	37
	4.1.2. Descriptores morfológicos cualitativos	38

4.1.3. Dendograma de caracterización morfológica	40
4.2. Análisis Molecular	47
4.2.1. Selección de los iniciadores AFLP	47
4.2.2. Índice de Contenido Polimórfico (PIC)	49
4.2.3. Dendograma de caracterización molecular	50
4.2.4. Análisis de Varianza molecular (AMOVA)	53
4.3. Relación entre la caracterización morfológica y molecular	54
V. CONCLUSIONES	57
VI. RECOMENDACIONES	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
VIII. ANEXOS	67

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Datos pasaporte de 138 accesiones de oca cultivada de la región Cajamarca	20
Cuadro 2.	Condiciones para la reacción de digestión de ADN de oca cultivada	26
Cuadro 3.	Condiciones para la reacción de ligación de ADN de oca cultivada	27
Cuadro 4.	Condiciones para la reacción de pre amplificación de ADN de oca cultivada	28
Cuadro 5.	Condiciones para la reacción de amplificación selectiva de ADN de oca Cultivada	30
Cuadro 6.	Estructura de la secuencia de los iniciadores AFLP seleccionados para las accesiones de oca cultivadas de la región Cajamarca	31
Cuadro 7.	Accesiones de morfotipos repetidos	41
Cuadro8.	Accesiones de ocas cultivadas que pertenecen al grupo A	43
Cuadro 9.	Accesiones de ocas cultivadas que pertenecen al grupo B	46
Cuadro10.	Combinaciones de iniciadores AFLP empleados y número de marcadores encontrados en 138 accesiones de oca	47
Cuadro 11.	Número y porcentaje de fragmentos polimórficos encontrados en las 7 provincias evaluadas de la región Cajamarca	49
Cuadro 12.	Valores de PIC para provincias de la región Cajamarca y por combinación de iniciadores AFLP	50
Cuadro 13.	Accesiones de ocas con nombres locales iguales a un coeficiente de similitud de 0.9	52
Cuadro 14.	Análisis de Varianza molecular (AMOVA) para 138 accesiones de oca cultivadas de 7 provincias de la región Cajamarca	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Producción, superficie cosechada y rendimiento del cultivo de oca en la región Cajamarca entre los años 1990-2013	17
Figura 2.	Ubicación de las provincias en estudio en el mapa político de la región Cajamarca	19
Figura 3.	Gel de agarosa al 1% en donde se muestra la calidad de ADN de 12 accesiones de ocas y marcador lambda (M) cortado con la enzima PstI	26
Figura 4.	Esquema de digestión de ADN genómico con enzimas de restricción EcoRI y MseI	27
Figura 5.	Esquema de ligación de ADN con adaptadores de las enzimas de restricción	28
Figura 6.	Esquema de reacción de PCR de pre-amplificación del ADN templado	29
Figura 7.	Esquema de reacción de amplificación selectiva del ADN templado	31
Figura 8.	Tamizado de iniciadores AFLP utilizando 8 accesiones de ocas cultivadas	32
Figura 9.	Dendograma de caracterización morfológica utilizando los marcadores morfológicos cualitativos para 138 accesiones de oca cultivada de la región de Cajamarca	40
Figura 10.	Variabilidad de forma, color y tamaño de los tubérculos de oca de la región Cajamarca	47
Figura 11.	Dendograma de Caracterización Molecular basado en 194 marcadores AFLP polimórficos de 138 ocas cultivadas de la región Cajamarca	51

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Descriptores morfológicos en oca según IPGRI (2001)	67
Anexo 2.	Materiales y equipos de laboratorio utilizados	70
Anexo 3.	Protocolo de extracción de ADN: Método CTAB con algunas modificaciones	73
Anexo 4.	Análisis de calidad y cuantificación de ADN	74
Anexo 5.	Preparación de geles de poliacrilamida	76
Anexo 6.	Reactivos para tinción de geles de poliacrilamida por el método de nitrato de plata	78
Anexo 7.	Descriptores cuantitativos de 138 accesiones de oca cultivada	80
Anexo 8.	Gráfico circular de marcadores morfológicos cualitativos	81

ABREVIATURAS

ADN : Ácido desoxiribonucleico
AFLP : Amplified fragment length polymorphism
AMOVA: Análisis de varianza molecular
CIP: Centro Internacional de la papa
CTAB : Bromuro de N,N,N-trimetilhexadecanamonio
dNTPS : Deoxinucleotidotrifosfato
EDTA :Ethylenediaminetetraaceticacid (Ácido etilendiaminotetraacético)
IPGRI: Institute for Plant Genetic Resources
ISSR: Inter simple sequencerepeats
MINCETUR: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo
NEB: New England Biolab
NRC: National Research Council
NTSYS : Numerical Taxonomy system
PCR :Polimerase Chain Reaction
PIC :Polymorphicinformationcoefficient
PROINPA: Promoción e Investigación de Productos Andinos
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
SAHN: Sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis
SSD: Sum of Squared Differences
SNP: Single nucleotide Polymorphism
SSR: simple sequence repeats
TBE: Tris/Borate/EDTA
TE: Tris/EDTA
T: Toneladas
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

RESUMEN

La oca (*Oxalituberosa*Mol.) es el tercer tubérculo más cultivado de los Andes después de la papa y el olluco y es considerada la especie, dentro de su género, de mayor importancia económica debido a su alto contenido de proteínas, carbohidratos, oxalatos y minerales; caracterizándose por su rusticidad, tolerancia a climas adversos y tener poca incidencia de plagas y enfermedades. En el presente estudio se caracterizó y evaluó morfológica y molecularmente 138 accesiones de oca cultivadas, recolectadas a lo largo de siete provincias de la región Cajamarca (Cajabamba, Cajamarca, Celendín, Chota, Cutervo, Hualgayoc y San Marcos). Se utilizó los descriptores morfológicos del IPGRI (2001) y seis combinaciones de iniciadores de AFLP. Con un coeficiente de disimilitud de cero, el análisis morfológico muestra 129 morfotipos diferentes y un porcentaje de duplicación de 6.5 por ciento, mientras que el análisis molecular con un coeficiente de similitud de uno arroja 138 genotipos diferentes. Los análisis de agrupamiento y AMOVA sugieren que la variabilidad genética de ocas se mantiene dentro de toda la región Cajamarca ya que la mayor fuente de variación se da dentro de las provincias estudiadas. Como conclusión se puede afirmar que la colección en estudio puede conservarse como material único en futuros programas de mejoramiento genético realizados para la región Cajamarca.

Palabras clave: oca, *Oxalituberosa*Mol., Análisis morfológico, AFLP, variabilidad genética.

ABSTRACT

Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) Is the third most cultivated tuber in the Andes after potato and olluco, and is considered the species in its genus, most economically important due to its high content of protein, carbohydrates, oxalates and minerals; characterized by its hardiness, tolerance to adverse weather and have low incidence of pests and diseases. In the present study, we characterized and evaluated morphologically and molecularly 138 accessions of cultivated oca, collected over seven provinces in the Cajamarca region (Cajabamba, Cajamarca, Celendin, Chota, Cutervo, San Marcos and Hualgayoc). Morphological descriptors of the IPGRI (2001) and six AFLP primer combinations were used. As a result, with a dissimilarity coefficient of zero, the morphological analysis showed 129 different morphotypes and a duplication percentage of 6.5 percent, while the molecular analysis with a similarity coefficient of one yields 138 different genotypes. The cluster analysis and the AMOVA suggest that genetic variability of the cultivated oca is maintained within the whole Cajamarca region as the major source of genetic variation occurs within the provinces. In conclusion we can say that the collection may be stored as a single study material for future breeding program conducted for the Cajamarca region.

Key Words: oca, *Oxalis tuberosa* Mol., Morphological analysis, AFLP, genetic variability.

RESUMO

A oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) é o terceiro tubérculo mais cultivado nos Andes depois das batatas e dos ollucos e é considerada a espécie em seu gênero, economicamente mais importante devido ao seu alto teor de proteínas, hidratos de carbono, oxalatos e minerais; caracterizado pela sua rusticidade, tolerância a condições meteorológicas adversas e baixa incidência de pragas e doenças. No presente estudo foram caracterizados e avaliados morfologicamente e molecularmente 138 acessos das oca cultivadas, coletados ao longo de sete províncias da região de Cajamarca (Cajabamba, Cajamarca, Celendín, Chota, Cutervo, e San Marcos Hualgayoc). Descritores morfológicos do IPGRI (2001) e seis combinações de primers AFLP foram usados. Com um coeficiente de dissimilaridade de zero, a análise morfológica mostra 129 morfotipos diferentes com uma percentagem de duplicação de 6,5 por cento, enquanto a análise molecular, com um coeficiente de similaridade de um, mostrou 138 genótipos diferentes. A análise de agrupamento e AMOVA sugerem que a variabilidade genética dos ocas é mantida dentro de toda a região de Cajamarca como a principal fonte de variação genética que ocorre dentro das províncias estudadas. Em conclusão, podemos dizer que a coleção pode ser armazenada como um único estudo futuro material de programa de melhoramento conduzido para a região de Cajamarca.

Palavras-chave: oca, *Oxalis tuberosa* Mol, análise morfológica, AFLP, variabilidade genética.

Dedicatoria

En memoria de Santiago

Para Rosita Erlinda

Para Mya Romina

Agradecimientos

Agradezco a AGROECO y al IDRC por el financiamiento de este trabajo de investigación, al PhD. Raúl Blas por su asesoría y su tiempo, a todos mis compañeros del Instituto de Biotecnología de la UNALM, especialmente a César (el chino), a Joelito y a Luchito. A mi familia y amigos por su comprensión, tiempo y cariño. A todos los que se vieron involucradas en mi aventura con las ocas, a todos ellos gracias totales

I. INTRODUCCIÓN

La oca (*Oxalis tuberosa* Molina) pertenece al género *Oxalis* y es considerada la especie, dentro de este género, de mayor importancia económica debido a su alto contenido de proteínas, carbohidratos, minerales y oxalatos (Talledo y Escobar, 1995). La oca es el tercer tubérculo más cultivado de los Andes después de la papa y el olluco (MINAGRI, 2012) caracterizándose por su rusticidad, tolerancia a climas adversos y tener poca incidencia de plagas y enfermedades; además se cultiva en terrenos y en altitudes donde otros cultivos alimenticios difícilmente prosperan, es de fácil manejo agronómico y no utiliza químicos (National Research Council, 1989).

El cultivo de oca ha sido realizado por comunidades campesinas en pequeñas parcelas bajo métodos tradicionales de agricultura. La oca conjuntamente con otros tubérculos andinos (mashua y olluco) forma parte de la dieta del agricultor y juega un rol importante en la seguridad alimentaria de este (Pastor *et al.*, 2008 citado por Emswiller *et al.*, 2009; Quinchuqui, 2009). Se conoce que la diversidad fenotípica de la oca es alta, sin embargo, su diversidad genética ha sido poco estudiada en el Perú y al parecer es baja lo que puede deberse a su reproducción netamente vegetativa, aunque también puede reproducirse por la vía sexual bajo condiciones controladas (Pissard *et al.*, 2006).

La clasificación de las variedades de oca se hace de acuerdo a la forma, apariencia externa, color y posterior uso de los tubérculos. Estas son nombradas en base a la percepción del agricultor (Ramirez, 2002). Las familias campesinas que son las poseedoras de este tubérculo andino conservan y protegen a sus cultivares por la utilidad que obtienen y por la fuerza de la tradición, en un contexto socio económico que en menor o mayor grado se encuentra ligado al mercado. Por lo tanto, la decisión de mantener, eliminar o incrementar cultivares en su germoplasma es influenciado por factores naturales, socioculturales y económicos (Programa Colaborativo Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos, 1996).

Una reducción del número de variedades de oca ha sido observada entre 1980 y 1990, esto ha sido atribuido a la producción de un pequeño número de variedades comerciales y a la reducción de la producción (en TM) de este cultivo en regiones como Cajamarca en la última década. Esta tendencia a la reducción de la diversidad de la oca (erosión genética) está asociada a la pérdida del conocimiento tradicional sobre el uso de la biodiversidad. (Terrazas y Valdivia citado por Pissard *et al.* 2008) y a la declinación de la agricultura tradicional como consecuencia de factores económicos, sociales y políticos (Quinchuqui, 2009). En este contexto un mejor entendimiento de la diversidad genética y morfológica que hay en el cultivo de oca es esencial para desarrollar estrategias de conservación apropiadas para esta especie (Pissard *et al.*, 2008).

Dado que la oca es una especie propagada principalmente de forma vegetativa y cultivada bajo sistemas agrícolas tradicionales ha sido hasta ahora un cultivo poco estudiado. El estudio de la diversidad de la oca contribuirá a un mejor entendimiento de la evolución de este cultivo (Pissard *et al.*, 2008); su caracterización morfológica y genética con marcadores moleculares nos permitirá una mejor comprensión de la diversidad de esta especie, lo que redundará en el desarrollo de programas de conservación. Debido a todo esto, en esta investigación se tiene como objetivo principal estudiar la variabilidad genética de las ocas cultivadas en la región Cajamarca para promover su conservación y uso sustentable, y como objetivos específicos se busca caracterizar la variabilidad morfológica; Analizar la variabilidad molecular e identificar los diferentes morfotipos de ocas cultivadas de la región de Cajamarca.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Familia *Oxalidaceae* y género *Oxalis*

La familia *Oxalidaceae* está formada por 6 géneros (Stevens, 2001) aunque algunos indican que hasta 8 géneros (The Plant List, 2013) los que estarían representados con 770 especies, de las cuales 700 son del género *Oxalis*. El género *Oxalis* está distribuido en América y África en su mayoría, aunque los *Oxalis* africanos tienen su origen en América del Sur, por lo que *Oxalis* es más diverso en esa región, particularmente en la zona sur. La alianza *Oxalictuberosa* es un grupo de especies morfológicamente similares a la oca que parece haber irradiado a lo largo de los Andes (Stevens, 2001).

En el Perú existen 4 géneros de la familia *Oxalidaceae* (*Oxalis*, *Biophytum*, *Hypseocharis* y *Averrhoa*) y unas 101 especies, de las cuales 44 son endémicas. Algunos de estos géneros muestran pequeños tubérculos, pero sólo la oca es considerada de importancia económica por sus tubérculos comestibles (Zorrilla, 2006).

2.2. Origen de la oca

La oca se distribuye desde Argentina hasta Venezuela (Ugent y Ochoa, 2006) entre los 2,000 a 4,000 m.s.n.m., (Fernandez *et al.*, 2007). Con una mayor distribución entre los 3000 y 3900 m.s.n.m. (Arbizu y Robles, 1986). Fuera de Sudamérica se le encuentra cultivada comercialmente (a baja escala) en México y Nueva Zelanda. (NRC, 1989).

La mayor diversidad morfológica se encuentra entre la región central de Perú (10° Lat. S) y el norte de Bolivia (20° Lat. S) (Arbizu y Tapia, 1992). Por lo que es muy probable que este tubérculo provenga del antiguo Perú, donde se encuentra la mayor

diversidad de especies. Uno de los centros más importantes de cultivo de oca se encuentra en las quebradas de Cuyo-cuyo, sobre el flanco oriental de los Andes (noreste de la región Puno, Perú) entre los 3,500 y 3,900 m.s.n.m. (Fernández *et al.*, 2007).

La oca es cultivada por pequeños grupos de agricultores andinos bajo sistemas tradicionales de agricultura y condiciones marginales y usualmente está relacionada con especies del género *Solanum* (Malice, 2009). Es propagada vegetativamente mediante tubérculos, aunque también se puede propagar por vía sexual bajo condiciones controladas (Pissard *et al.*, 2006).

2.2.1. Taxonomía de oca

El nombre “oca” proviene de la palabra Quechua “Okka”, “oqa” o “uqa”. Según Chase & Raveal (2009) la oca se clasifica de la siguiente manera:

DIVISIÓN: EQUISETOPHYTA

CLASE: EQUISETOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIIDAE

SUPERORDEN: ROSANE

ORDEN: OXALIDALES

FAMILIA: OXALIDACEAE

Género: *Oxalis*

Especie. *Oxalis tuberosa* Molina.

A esta especie se le conoce con los siguientes nombres comunes: “Oca”, “apilla”, “apio blanco”, “papa extranjera”, “quiba”, “cuiva”, “pignas”, “okka”, “o`qa”, “Ibia” (National Research Council, 1989; Arbizu y Tapia 1992, Medina, 1994 y Becerra, 1995).

2.3.Descripción botánica

La oca es una especie dicotiledónea de hábito vegetativo herbáceo anual. Presenta una reproducción asexual por medio de tubérculos (Orbegoso, 1957).

El tallo es aéreo, herbáceo, cilíndrico y succulento, puede ser simple o ramificado (Orbegoso, 1957). Comúnmentefasciados, planos y de estrías longitudinales (Cárdenas, 1969).

La epidermis es densamente pubescente. Ésta pubescencia se encuentra distribuida uniformemente por toda la planta, aunque aparentemente parece más densa en el ápice por los entre nudos cortos (Orbegoso, 1957; Cárdenas, 1989).

Las hojas son trifolioladas, alternas y pinnaticompuestas. Presentan pubescencia en la cara superior y el color varía entre verde a purpura, la parte superior es glabra (Robles, 1981).

El tipo de inflorescencia es muy variable. En algunos casos es umbeliforme y en otros se presentan cimas irregulares. Cada inflorescencia lleva de 5 a 12 flores pedunculadas (Orbegoso, 1957).

Las flores son pentámeras y bisexuales. Presentan una coloración amarillo-anaranjada pronunciado. El cáliz está constituido de cinco sépalos imbricados y soldados entre sí. La corola está formada por cinco pétalos festoneados de color amarillo-anaranjado, recorridos en todo su largo por delgadas estrías púrpuras (Orbegoso, 1957).

Los estambres se encuentran en número de 10, y son del tipo monadelfo. En la madurez presentan una dehiscencia longitudinal. El gineceo está constituido de un pistilo compuesto de 5 carpelos (pentaloculado) soldado axilarmente. Tiene ovario súpero que aloja en su interior de 20 a más óvulos anátropos sujetos a la placenta central (Orbegoso, 1957).

Las flores de *O. tuberosa* presentan heterostilia también llamada hercogamia recíproca, esta es una estrategia que presentan aquellas flores en las cuales las anteras y estigmas están muy separados unos de otros, generalmente reduce la autopolinización intrafloral, tal como la dicogamia.La oca presenta tristilia, es decir tiene tres tipos diferentes de flores según el largo del estilo: longistilas, si el estilo es

mayor que la columna estaminal; mesostilas, si el estilo está al mismo nivel de la columna estaminal, y brevistila si el estilo es menor que la columna estaminal. (Arbo *et al.*, 2001-2008). Se ha comprobado que estas tres formas tienen estrecha relación con el color de los tubérculos: las flores longistilas corresponden a la variedad de tubérculos amarillos; las mesostilas, a los blancos, y las brevistilas, a los rojos (Orbegoso, 1957).

El fruto es una capsula con dehiscencia loculicida que a la madurez expele la semilla en forma explosiva, estas semillas se forman en número de uno a tres o más en cada lóculo, son elipsoidales, de superficie granulosa y de color amarillentas (Orbegoso, 1957; Carrión *et al.*, 1995).

La obtención de semillas es casi nula debido a que la abscisión de la flor ocurre antes de que estas maduren. Esto sucede en la gran mayoría de las flores de oca. Sin embargo, se han encontrado algunas flores fecundadas que no sufrieron la abscisión y cuyas semillas eran normales (Orbegoso, 1957). Alandia (1967) citado por Emshwiller (2002), demostró que la oca cultivada produce semillas viables y que es factible desarrollar programas de conservación de germoplasma utilizando semilla botánica. Bonnave *et al.*, (2013) observaron la formación frecuente de semillas en flores de oca durante su trabajo de campo en el periodo 2009 a 2012 en los departamentos de La Paz y Cochabamba – Bolivia.

La propagación vegetativa de la oca determina la formación de vástagos aéreos, raíces adventicias, estolones y tubérculos. El sistema radical es adventicio y fasciculado. La raíz es ramificada, teniendo numerosas raíces laterales que a su vez se ramifican llegando a penetrar profundamente en el suelo, por lo que el sistema absorbente es muy eficaz. El tallo subterráneo tipo tubérculo es un tallo especializado para la propagación vegetativa. Los tubérculos presentan formas variables pudiendo ser cilíndricos, ovoides, claviformes o elipsoidales (Cárdenas, 1969; IPGRI-CIP, 2001). Los tubérculos presentan hojas escamosas que ocultan los ojos que presentan verdaderos meristemas primarios (Adrianzen, 2007).

2.4. Ciclo celular y ploidía

La duración del ciclo celular de la oca es de 75 minutos pudiendo prolongarse hasta las seis horas. Se registran alteraciones en el curso del ciclo celular, particularmente ciclos incompletos y una notable incidencia de ciclos irregulares como por ejemplo un bloqueo parcial en la profase y en la telofase. La alternancia de fases normales con mitosis irregulares podría condicionar en estas especies la diversidad de reportes para el número cromosómico y constituir uno de sus probables mecanismos de poliploidización (Talledo y Escobar, 1995).

Aunque el origen de la oca es poco conocido, los conteos de cromosomas demuestran que presenta poliploidía en la mayoría de los casos, lo que refleja su capacidad de adaptación a condiciones climáticas severas y altas elevaciones (Del Rio, 1990; Talledo y Escobar, 1995). Heinz en 1927 estudió el número cromosómico de 31 especies del género *Oxalis* y describió a la oca como una especie diploide con solo 14 cromosomas y número básico $x = 7$ (Marks, 1956). Kostoff *et al.* (1935) reportan 64 cromosomas en algunas formas de oca, y en otras hallaron entre 68 a 70. Mientras que Cárdenas y Hawkes (1948) señalan que en células somáticas de oca colectada en Bolivia han encontrado $2n = 66$ cromosomas, Gibbs, Marshall y Brunton (1978) reportaron entre 58 y 66 cromosomas y un número básico $x = 11$, así como la formación de multivalentes y otras anormalidades durante la meiosis. Hayano (1998), reporta un número cromosómico igual a 49 con un número básico de $x=7$ para variedades provenientes de la región de Huancayo y La Libertad, esto se podría explicar por la conducta quimérica que presenta esta especie.

De Azkue y Martínez (1990) fueron los primeros en describir citológicamente la Alianza *Oxalis tuberosa*. Al evaluar 10 diferentes cultivares de *O. tuberosa* encontrando que esta especie es octoploide ($2n=8x=64$). Resultados similares han sido reportados por Valladolid (1996) y Medina (1994).

Emshwiller (2002), describe la Alianza *Oxalis tuberosa* como un grupo de especies morfológicamente similares a la oca, en donde la mayoría de estas especies silvestres son diploides, mientras que la oca cultivada es octoploide. En su estudio empleo citometría de flujo para analizar la ploidía de accesiones de la Alianza *Oxalis tuberosa* de Bolivia y Perú proporcionando además los primeros datos sobre el

tamaño del genoma de estas especies. En este análisis, el 100% de las accesiones evaluadas fueron octoploides, con un contenido de ADN nuclear promedio de 3.6 pg/2C. Emshwiller y Doyle (2002) sugieren que la oca cultivada es una especie aloploide y tal vez auto-aloploide y podría haberse originado por hibridación entre dos especies silvestres que provinieron de Bolivia y Perú.

2.5. Usos de la oca

La oca es un alimento importante en las regiones donde se cultiva por sus excelentes propiedades nutricionales, así como también por sus propiedades medicinales. Los tubérculos tienen una elevada cantidad de carbohidratos por lo que es usado como una importante fuente energética ya que proporcionan un alto nivel de calorías (Estrella, 1986). El tubérculo de oca presenta en promedio un porcentaje de humedad de 70 a 80 por ciento, 11 a 22% de carbohidratos con un almidón de fácil digestibilidad (Fernandez *et al.*, 2007), y alrededor de 1% de grasas, fibra y ceniza por cada uno (NRC, 1998).

La cantidad de proteínas es variable por cada tipo de oca; habiendo tubérculos con más de 9% de proteína en base a materia seca y de muy buena calidad, lo cual es excelente para una tuberosa, y teniendo un buen balance de aminoácidos (NRC, 1998). Además de contener minerales como: calcio, fósforo, hierro, retinol, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y oxalatos solubles lo que les da un sabor ligeramente ácido (Fernandez *et al.*, 2007; Mostacero *et al.*, 2011).

Los agricultores distinguen entre las características culinarias de los tubérculos, y las describen como dulces o amargas y en cuanto a su textura como harinosa, aguada y firme. (Emshwiller, 2004). Estos consumen los tubérculos crudos, sancochados o asados (en sopas y guisos o chupes), o deshidratados, y también en forma de postre. En los Andes, las variedades dulces de oca se sirven crudas o cocidas, ya sea sola o acaramelada, en diferentes platos tradicionales (Ugenty Ochoa, 2006). Los tubérculos también pueden ser secados al sol por varios días con el objetivo de eliminar el sabor amargo, y acentuar el contenido de azúcar (Fernandez *et al.*, 2007).

Algunas variedades ‘dulces’ presenta poca cantidad de oxalatos con valores como 79ppm de ácido oxálico (NRC, 1998).

Las variedades amargas son ricas en oxalatos de calcio con valores reportados hasta 500ppm, según la NRC (1998), se las cocina para hacerlas comestibles. Estas se agregan con frecuencia a guisos y sopas o también pueden ser cocinadas al vapor, hervidos o cocidos al horno como las papas. Las variedades amargas también pueden ser deshidratadas, en un proceso similar al que se sigue con el chuño de las papas. (Ugent y Ochoa, 2006).

El chuño, *kaya* o *khaya*(tubérculos deshidratados de oca) tiene un valor nutritivo igual que la papa (9% de proteínas), y se prepara sumergiendo en agua los tubérculos, inmediatamente después de cosecharlos y antes que los toque los rayos solares. En ese estado permanecen por un espacio de tiempo de 3 ó 4 semanas hasta que las yemas tomen una coloración morada, en seguida se las somete a la acción del frío (hielo-ambiente) durante 3-4 días y después de pisotearlas se hace secar al sol-ambiente durante igual periodo de tiempo. La *kaya* es utilizada por las mujeres andinas después del parto (Fernandez *et al.*, 2007).

2.6.Diversidad Genética

2.6.1. Concepto de Diversidad

La diversidad de una especie está constituida por todas las variaciones genéticas, producto de la diferencia de esta. La variabilidad genética se aplica a las características. Si no hay variación genética para una característica dentro de una población, el carácter no puede ser modificado por selección. Si un cambio en el ambiente o en las condiciones de vida afecta a esa característica, puede desaparecer toda la población. Los individuos de una especie difieren entre sí en muchas características. Esas diferencias tienen causas genéticas y ambientales. No se debe confundir diversidad genética con variabilidad genética. La variabilidad genética está constituida por las diferentes características dentro de una especie. Las especies pueden ser más o menos variables. La variabilidad genética se aplica a las

características que pueden ser cuantificadas en términos de variancia genética aditiva y no aditiva (Sevilla y Holle, 2004).

2.6.2. Caracterización Morfológica de la oca

El sistema de autoincompatibilidad del tipo gametofítico (Carrión, 1995) presente en la oca, la consiguiente polinización cruzada y la selección por los agricultores andinos deben haber influido en la existencia de la gran diversidad de colores y formas de tubérculos, así como en el número y profundidad de los ojos. La alta variabilidad encontrada en el color de los tubérculos sugiere una variación continua, ya que el color varía desde el blanco hasta el negro, pasando por distintas tonalidades de amarillo, rosado, y rojo. El color de la pulpa también parece seguir una variación continua pero en menor escala que el color de la piel. Asimismo, una gran cantidad de los tubérculos de oca presentan el anillo vascular del tubérculo pigmentado con la misma coloración de piel (Arbizu y Tapia, 1992).

Esta gran diversidad morfológica observada principalmente en los tubérculos, se refleja en los distintos nombres de los cultivares reconocidos por los agricultores. Cada nombre está asociado a cualidades específicas en el sabor, almacenamiento, valor del tubérculo-semilla, método de consumo y valor en el mercado (King y Gershoff, 1987).

En la comunidad de Picol en Cuzco, los campesinos reconocen principalmente el color de la piel y el color, forma, distribución de los ojos en el tubérculo. También consideran la textura y el sabor y ocasionalmente el color de la medula. Muy pocos campesinos distinguen a la oca por alguna característica aérea de la planta. La mayoría de los agricultores usan nombres para diferenciar a los tubérculos aunque se halló que no existe mucha consistencia en el uso de nombres y estos pueden variar de comunidad en comunidad (Ramirez, 2002).

Arbizu *et al.* (1997) evaluaron 227 accesiones de oca mantenidas en el banco de germoplasma del CIP y las separaron teniendo en cuenta su similitud morfológica y encontraron 146 morfotipos. Se encontró que probablemente un 36% de las ocas del banco son duplicadas.

2.6.3. Marcadores Moleculares

Cada secuencia de ADN es única y propia de un individuo, siendo esta información útil para estudios de diversidad genética y de relaciones entre organismos. Los marcadores moleculares nos permiten observar los polimorfismos de una secuencia de ADN en un cierto número de sitios o *loci* a través del genoma, así los marcadores de ADN se definen como una pequeña región del genoma que muestra, en diferentes individuos de una especie, un polimorfismo de secuencia no asociado con ninguna alteración fenotípica medible. Estos polimorfismos, los cuales son definidos como la ocurrencia simultánea de genomas en una población de individuos que muestran variaciones en una posición específica dada, son productos de modificaciones en las secuencias, bajo la acción de factores endógenos y exógenos(Oyanedel, 2010).

Los marcadores moleculares tienen una serie de características favorables en comparación con los marcadores morfológicos ya que permiten revelar un mayor número de polimorfismos puesto que identifican también las mutaciones silenciosas y sinónimas escondidas en las proteínas, además no se encuentran influenciados por el ambiente o por interacciones genéticas complejas y son considerados en general caracteres neutrales, con muy poco o ningún valor adaptativo (Gonzales, 2008).

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares de los cuales se obtiene información de diferente naturaleza. Las dos categorías principales son: a) marcadores codominantes, como por ejemplo los marcadores microsatélites, que revelan las diferentes variantes de un alelo (llamados multi - alelos), pero analizan sólo un locus y se necesita información previa de las secuencias y b) los marcadores dominantes, como por ejemplo los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) que permiten la detección de la presencia o ausencia de un alelo por cada locus pero simultáneamente para un gran número de *loci* (multi locus). Estos multi locus detectados son individualmente menos informativos, sin embargo, los sistemas de marcadores moleculares dominantes alcanzan su poder estadístico al presentar numerosos *loci* di - alélicos del genoma entero. Así una técnica de marcadores moleculares de tipo dominante puede llegar a superar a una de marcadores codominantes en la discriminación de taxas y poblaciones(Oyanedel, 2010).

Para estudios a nivel de género y taxones superiores como familia y orden, están disponibles en el genoma nuclear y en el de los plastidios un amplio rango de secuencias. Sin embargo, para estudios entre géneros o especies cercanamente relacionados, las secuencias a menudo no muestran una variación suficiente. A estos niveles menores, los fragmentos de restricción podrían ser marcadores filogenéticos adecuados(Oyanedel, 2010).

2.6.4. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Los AFLP son un tipo de marcador anónimo o inespecífico que se desarrolla independientemente de la secuencia de ADN para la identificación y caracterización de los *loci* polimórficos. La técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) no se dirige a la amplificación específica de un locus de una secuencia conocida, sino a la amplificación aleatoria de múltiples regiones repartidas a lo largo del genoma, cuyas secuencias flanqueantes resultan complementarias a iniciadores diseñados al azar. La identificación de este tipo de marcadores depende de la existencia de polimorfismos en los sitios de unión de los iniciadores o bien de diferencias de longitud en los fragmentos amplificados. Las diferencias alélicas en un mismo locus se distinguen, generalmente, por la presencia o ausencia de una banda de un determinado tamaño (Gonzales, 2008).

La técnica de AFLP es una herramienta muy efectiva para estudiar polimorfismos y, en un principio, se desarrolló para evidenciar las diferencias entre cultivares de especies de plantas, también se ha utilizado para analizar polimorfismos genéticos de hongos, corales, insectos, nematodos, peces y mamíferos.

Los marcadores que generan los AFLP, aunque a menudo se encuentran concentrados en regiones centroméricas, están ampliamente distribuidos a través del genoma, permitiendo una apreciación de su variación. Son marcadores anónimos y consisten, principalmente, de ADN no codificante. El origen predominantemente nuclear de los marcadores generados mediante AFLP es una ventaja, porque los marcadores derivados de genomas organelares heredados uniparentalmente (ADN cloroplastidial o mitocondrial) podrían presentar una variabilidad insuficiente particularmente en plantas, donde son importantes algunos procesos como la hibridación.

El método está basado en una amplificación selectiva de fragmentos resultantes de la digestión del ADN genómico y consta de las siguientes etapas: a) Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y ligación de los adaptadores, b) Amplificación selectiva de los fragmentos de restricción y c) Separación y análisis de fragmentos amplificados mediante electroforesis.

Mediante el uso de iniciadores genéricos se puede lograr la amplificación de gran número de fragmentos de restricción a la vez que se visualizan como bandas o picos, las bandas obtenidas corresponden a alelos dominantes, ya que los individuos homocigotos que presentan la banda no se pueden distinguir de los heterocigotos. Así para cada locus, la ausencia de la banda probablemente corresponde a un set heterogéneo de secuencias. La selectividad puede aumentar agregando nucleótidos específicos a los iniciadores en el extremo 3', pues sólo se amplificarán los fragmentos de restricción cuyos nucleótidos que flanquean el sitio de restricción sean complementarios. Para genomas de gran tamaño, tales como las plantas, se desarrolla un protocolo de amplificación de dos etapas utilizando una segunda reacción de PCR con un mayor número de nucleótidos selectivos para ambos iniciadores.

El método de AFLP ha sido una herramienta útil para diferentes aplicaciones en las que no se conoce la secuencia nucleotídica por ejemplo el mapeo de la variabilidad genética, la migración de especies, y análisis filo y bio geográficos.

Esta técnica de AFLP puede ser aplicada en las siguientes situaciones: a) cuando no existe información a priori de la secuencia, b) para estudios a nivel intra-específico, c) cuando la variabilidad genética es baja, d) para la rápida generación de datos, e) cuando se dispone de alta calidad de ADN y f) cuando no se han establecidos marcadores adecuados.

2.6.5. Análisis moleculares en oca

Toledo *et al.* (1995) evaluaron accesiones de oca usando RAPDs. De 60 *primers* 18 fueron polimórficos. Emshwiller y Doyle (1997), realizaron análisis filogenéticos de secuencias de DNA de la oca cultivada y de algunas especies silvestres esto sugirió que la oca cultivada tiene cierta relación con las especies silvestres. Resultados preliminares con un gen nuclear sugieren que la oca es una especie aloploiploide, con

por lo menos dos progenitores. Donayre (2000), estimó la variabilidad de 19 morfotipos de oca de la comunidad de Picol (Cusco), obtuvo un 36% de polimorfismo dentro de la población y en general no encontró un alto grado de variabilidad.

Emshwiller (2001), evaluó la utilidad de los marcadores AFLP, sus resultados arrojaron que estos marcadores tienen variación suficiente para distinguir los genotipos y serán útiles como marcadores moleculares para la oca cultivada.

Schibli (2007), comprobó la utilidad de los AFLP para el análisis de diversidad genética de las ocas cultivadas en las comunidades de Matinga y Poques (Cusco), y se evidenció que la diversidad genética de las ocas de estas comunidades no son comparables con la alta diversidad morfológica de sus tubérculos.

Emshwiller (2004), diferencia los cultivos de propagación clonal de los cultivos de propagación sexual en su evolución y las necesidades para su conservación. En una comparación de la etnotaxonomía de variedades de oca con los clones distinguidos por AFLP, los resultados mostraron congruencia general entre datos moleculares y la clasificación que realizaron los agricultores.

Pissard *et al.* (2006), evaluó 90 marcadores ISSR en 32 accesiones de oca procedente de Argentina, Bolivia, Chile y Perú, encontrando que la distancia genética promedio empleando el coeficiente de similitud de *Jaccard* fue de 0.28 +/- 0.08. También encontró que la mayor diversidad genética ocurría entre las ocas procedentes de Perú y ocas procedentes del resto de países. Postula que la relativamente baja diversidad genética puede deberse al sistema de reproducción vegetativa que caracteriza al cultivo de oca.

Zorrilla (2006), estudio la diversidad de 92 cultivares de oca usando descriptores morfológicos y AFLP, demostró que las correlaciones entre los nombres locales, los grupos morfológicos y el agrupamiento molecular de las ocas procedentes de Puno mostraron un buen nivel de congruencia.

Biondi (2006), empleo AFLP para evaluar la diversidad genética de la colección de oca mantenida por el CIP (585 accesiones provenientes de Argentina, Bolivia, Chile y Perú). Su investigación demostró que el Perú es el país con mayor diversidad entre las accesiones provenientes de la colección de oca del CIP.

Ugarte y Baudoin (2004), evaluaron la variabilidad genética de la oca existente en Banco de Germoplasma de PROINPA (Cochabamba), el análisis de datos geográficos corroboró que la región de alta diversidad de la oca se sitúa en torno al lago Titicaca.

Adrianzen (2007), analizó la diversidad genética de ocas de 4 comunidades de Cusco usando AFLP comprobando la capacidad que tiene este tipo de marcador para revelar la variación genética entre las entradas de oca y su buena amplificación y reproducibilidad. Además demostró la baja relación entre los agrupamientos basados en los nombres locales y su agrupamiento basado en el análisis molecular, y la baja diversidad entre las entradas de oca de las 4 comunidades, sino más bien una importante diversidad genética dentro de cada una de las comunidades.

Moscoe y Emshwiller (2014), analizaron la utilidad de los marcadores AFLP y microsatélites (SSR) para el estudio de la diversidad de *O. tuberosa*. Obtuvieron 26 genotipos diferentes de AFLP de las 27 muestras analizadas, mientras que para SSR obtuvieron los 27 genotipos distintos. Además de observar que ambos marcadores arrojaban resultados de acuerdo con los grupos morfotipos establecidos y grupos separados con similar distancia. Comprobaron que para las muestras analizadas los marcadores AFLP y SSR arrojaban similares patrones de agrupamiento.

2.7. Departamento de Cajamarca

El departamento de Cajamarca se encuentra ubicado en la Sierra norte del país, en la cadena occidental de los Andes y abarca zonas de sierra y selva. La superficie de su territorio abarca 33, 317.54 Km² lo que equivale al 2.8% de la superficie del Perú. Por el norte limita con la República de Ecuador, Por el sur con el departamento de la Libertad, por el Este con el departamento de Amazonas y por el Oeste con los departamentos de Lambayaque y Piura.

El departamento de Cajamarca está constituido por 13 provincias y 127 distritos. Las provincias son: Cajabamba, Cajamarca, Celendín, Chota, Contumazá, Cutervo, Hualgayoc, Jaén, San Ignacio, San Marcos, San Miguel, San Pablo y Santa Cruz. Tiene una población de 1, 515 827 habitantes densidad poblacional de 45.5 habitantes por kilómetro cuadrado.

El clima en el departamento de Cajamarca es variado con temperaturas que fluctúan entre 23°C (regiones costeras) hasta 28°C en la ceja de selva y 4°C en la Sierra. La precipitación anual es de 200 a 1500 mm, la temporada de lluvias se extiende desde Diciembre hasta Abril. En cuanto a la altitud esta va desde los 175 hasta los 4496 m.s.n.m., siendo Cerro Pitura (Contumazá) la zona más baja y Rumi-Rumi (Cajabamba) la zona más alta. En cuanto a los ecosistema la región de Cajamarca cuenta con siete: Páramo, Jalca, Bosques Andinos estacionales, Bosques montanos de neblina, Bosques secos del Marañón, Bosques secos del pacífico y Desierto(MINCETUR, 2014).

En el departamento de Cajamarca, la oca tiene una participación poco protagónica dentro de los cultivos sembrados en la producción agropecuaria. En la figura 1, se muestran datos estadísticos sobre la producción de oca en toneladas, la superficie de área cosechada en hectáreas y el rendimiento de oca en kg/ha entre los años 1990 al 2013. (MINAGRI, 2015).

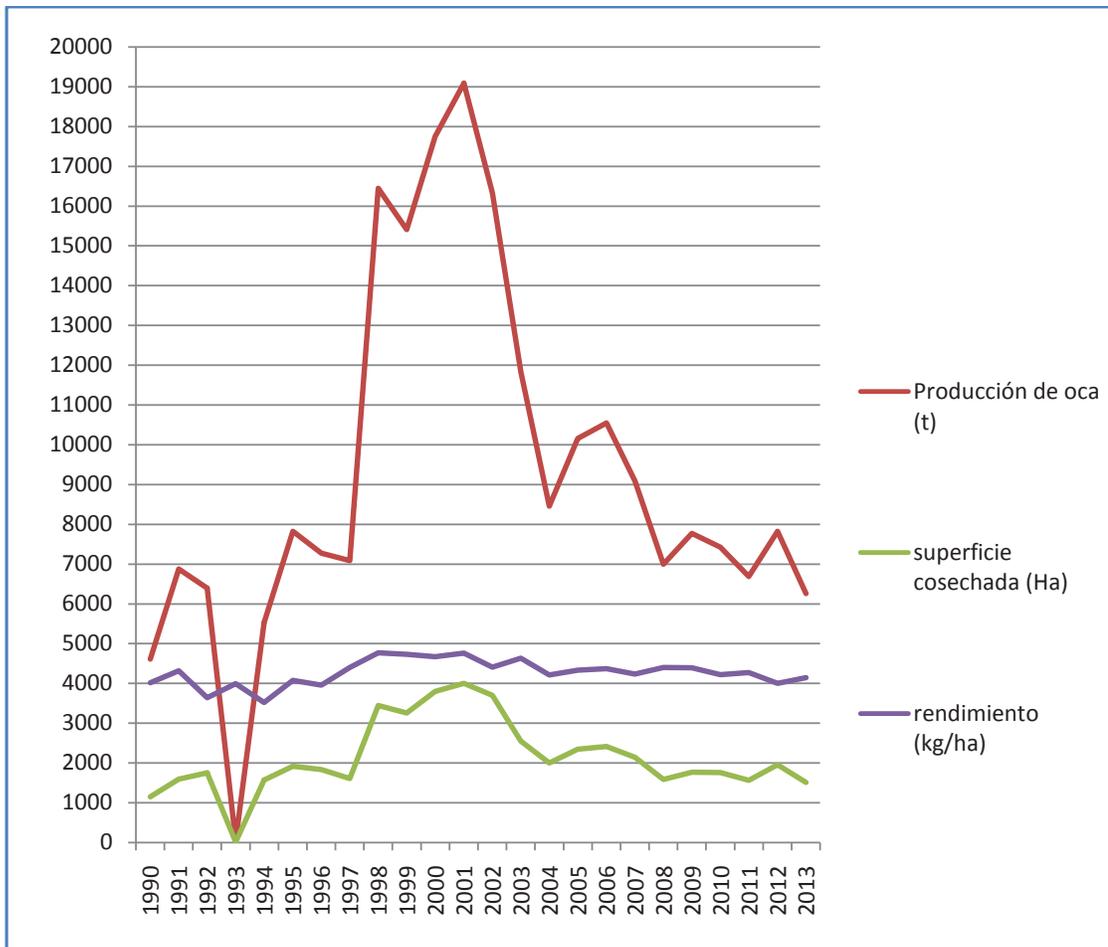


Figura 1: Producción, Superficie cosechada y Rendimiento del cultivo de oca en la región Cajamarca entre los años 1990-2013

Se puede observar que el rendimiento de oca se ha mantenido prácticamente igual en los últimos 24 años, por lo que nos lleva a pensar es un cultivo poco trabajado y no existe tecnología agrícola adecuada para su producción.

Dentro de las variedades de oca cultivadas en Cajamarca encontramos algunas como: Chaucha blanca, Sapa amarilla, chaucha amarilla, Amarilla jaspeada, Sarca, Crema ojo rosado, Mulla, Huayta colorada, Piña negra, Chaucha negra, etc.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Campo Experimental

3.1.1. Ubicación

Este estudio se llevó a cabo en el caserío de Carbón Alto, ubicado en el Distrito de Gregorio Pita, provincia de San Marcos, región de Cajamarca a una latitud de $7^{\circ} 11' 31.2''$, longitud de $78^{\circ} 11' 15.1''$ y altitud de 3980 m.s.n.m. y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicada a una latitud de $12^{\circ} 04' 47''$, longitud de $76^{\circ} 56' 41''$, y a una altitud de 243 m.s.n.m.

3.2.Material Vegetal

En el presente trabajo, para la caracterización morfológica y molecular se utilizaron 138 accesiones de ocas cultivadas de la región Cajamarca. Estas fueron colectadas a lo largo de siete provincias las cuales fueron: Cajabamba (26 accesiones), Cajamarca (6 accesiones), Celendín (14 accesiones), Chota (13 accesiones), Cutervo (3 accesiones), Hualgayoc (28 accesiones) y San Marcos (48 accesiones). El mapa político de la región Cajamarca con las provincias estudiadas se muestran en la figura 2.

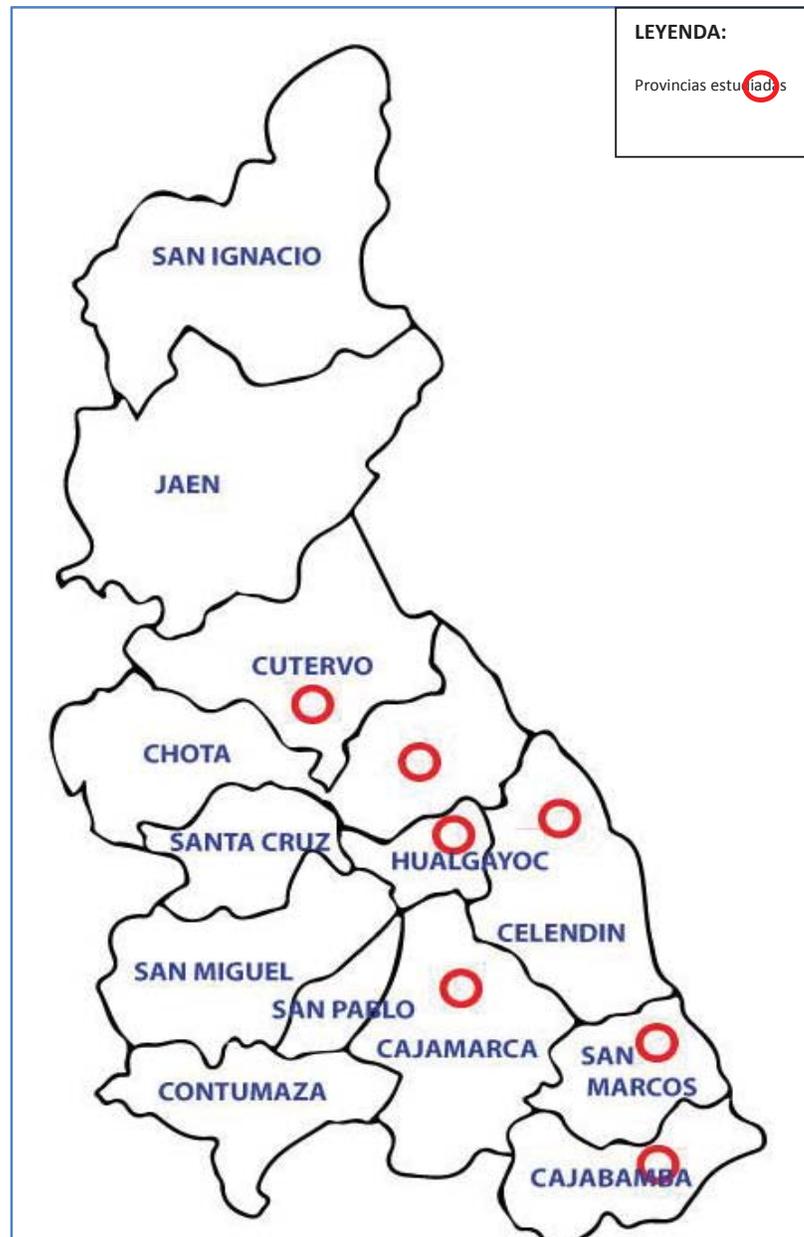


Figura 2: Ubicación de las provincias en estudio en el mapa político de la región Cajamarca

El material vegetal usado en esta investigación fue colectado dentro del proyecto de Intensificación Ecológica y Socioeconómica de la Pequeña Agricultura Andina (AGROECO) en el año 2011.

En el cuadro 1 se muestran los datos pasaporte de las 138 accesiones de oca cultivadas utilizadas en el presente estudio.

Cuadro 1: Datos pasaporte de 138 accesiones de oca cultivada de la región Cajamarca

Entrada	Variiedad	Localidad	Distrito	Provincia	Altitud	Latitud	Longitud
UNACO-001	Oca Colorada	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-002	Oca Mora	Agua Blanca	Jose Sabogal	San Marcos	3825	07°14.858"	78°03.653"
UNACO-004	Chantina	Agua Blanca	Jose Sabogal	San Marcos	3825	07°14.858"	78°03.653"
UNACO-006	Colorada	La Ramada	Jose Sabogal	San Marcos	3887	07°12.613"	78°04.813"
UNACO-007	Zapallo amarillo	La Ramada	Jose Sabogal	San Marcos	3887	07°12.613"	78°04.813"
UNACO-009	Antiada	Agua Blanca	Jose Sabogal	San Marcos	3838	07°14.720"	78°03.750"
UNACO-010	Oca Piña	Agua Blanca	Jose Sabogal	San Marcos	3838	07°14.720"	78°03.750"
UNACO-014	Extranjera	Rumi Rumi	Cajabamba	Cajabamba	3440	07°39.690"	78°00.360"
UNACO-017	Amarilla Camotilla	Rumi Rumi	Cajabamba	Cajabamba	3440	07°39.690"	78°00.360"
UNACO-019	Oca Huayta	Campo Alegre	Namora	Cajamarca	3884	07°07.627"	78°10.269"
UNACO-022	Oca Ojo Morado	Campo Alegre	Namora	Cajamarca	3884	07°07.627"	78°10.269"
UNACO-023	Oca Piña Ojosa	Campo Alegre	Namora	Cajamarca	3884	07°07.627"	78°10.269"
UNACO-025	Oca Raspiada	Campo Alegre	Namora	Cajamarca	3884	07°07.627"	78°10.269"
UNACO-026	Zapalla Morada	Campo Alegre	Namora	Cajamarca	3884	07°07.627"	78°10.269"
UNACO-027	Oca Negra	Campo Alegre	Namora	Cajamarca	3884	07°07.627"	78°10.269"
UNACO-028	Oca Chuchona	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-030	Oca Chaucha	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-031	Oca Colorada	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-032	Oca Maguay	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-034	Oca Amarilla	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-035	Oca Piña	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-037	Oca Antiada Morada	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-038	Oca Mulla	La Totorilla	Pedro Galvez	San Marcos	3914	07°15.727"	78°04.033"
UNACO-041	Oca Manteca	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-042	Oca Limeña	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-045	Oca Extranjera	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-046	Oca Cabeshona	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-050	Oca Extranjera	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-053	Oca Cabesona	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-059	Oca Cabeshona	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-060	Oca Aroma	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-061	Oca Retama	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-065	Oca Riñona	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-066	Oca Amarilla Grande	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-067	Oca Manteca	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-068	Oca Chaga Bara	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-071	Oca Negrita	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-072	Oca Camotillo	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-073	Oca Limeña	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-074	Oca Extranjera	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-075	Oca Camotillo	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-076	Oca Venadita	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"

Continuación del Cuadro 1.

Entrada	Variiedad	Localidad	Distrito	Provincia	Altitud	Latitud	Longitud
UNACO-079	Oca Chaucha	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-080	Oca Blanca Leche	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-081	Oca Cabeshona	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-082	Oca Extranjera	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-083	Oca Rosada	Suro Chico	Sitacocha	Cajabamba	3696	07°35.563"	77°56.514"
UNACO-085	Oca Colorada	Crusconga	Sucre	Celendin	2650	06°52.094"	78°08.864"
UNACO-087	Oca Mulla Negrita	Crusconga	Sucre	Celendin	2650	06°52.094"	78°08.864"
UNACO-097	oca huayta	Aushoconga	Jose Sabogal	San Marcos	3492	07°10.017'	078°02.796'
UNACO-098	oca chaucha	Aushoconga	Jose Sabogal	San Marcos	3492	07°10.017'	078°02.796'
UNACO-100	oca amarilla	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3899	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-102	oca blanca	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3901	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-103	pilpina	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3902	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-104	chaucha	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3903	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-105	huayta	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3904	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-105B	huayta	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3904	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-106	oca colorada	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3905	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-107	oca piña	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3906	07°13.717'	078°12.398'
UNACO-109	oca serrina	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3865	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-110	oca aserrina	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3866	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-111	oca sarca	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3867	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-112	oca blanca	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3868	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-113	oca huayta	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3869	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-114	oca chaucha	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3870	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-115	oca amarilla	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3871	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-116	oca anteada	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3872	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-117	oca pimpina	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3873	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-118	oca chaucha negra	Carbón Bajo	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3874	07°11.017'	078°12.413'
UNACO-119	chaucha blanca	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3660	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-121	rosado	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3662	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-122	chaucha redonda	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3663	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-123	camotera	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3664	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-125	piña blanca	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3666	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-126	blanca	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3667	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-129	para cochi	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3670	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-130	zapalla	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3670	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-131	chaucha colorada	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3670	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-136	llaucano	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3670	06°49.270'	078°20.233'

Continuación del Cuadro 1.

Entrada	Variiedad	Localidad	Distrito	Provincia	Altitud	Latitud	Longitud
UNACO-138	chaucha blanca	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3670	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-140	sumbatina negra	Shilaja Alto	Huasmin	Celendín	3670	06°49.270'	078°20.233'
UNACO-145	cajamarquina	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3240	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-147	mulata mulata	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3242	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-148	pipi de mono	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3243	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-149	morochita	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3244	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-150	sumbatina blanca	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3245	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-151	colerina	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3246	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-153	shilicana colorada	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3248	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-154	pimpinela	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3248	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-155	chotana	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3236	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-156	piña blanca	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3237	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-158	shilicana	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3239	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-159	piña morada	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3240	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-160	sumbatina	Huayracitana	Chalamarca	Chota	3241	06°34.134'	078°29.688'
UNACO-161	imperial	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3669	06°43.260'	078°22.680'
UNACO-163	shilico negro	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3671	06°43.260'	078°22.680'
UNACO-165	piña amarilla	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3673	06°43.260'	078°22.680'
UNACO-167	crespa	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3675	06°43.260'	078°22.680'
UNACO-168	tucta	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3676	06°43.260'	078°22.680'
UNACO-169	crespa	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3626	06°43.172'	078°22.570'
UNACO-170	sumbatina	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3627	06°43.172'	078°22.570'
UNACO-172	antuca	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3629	06°43.172'	078°22.570'
UNACO-173	piña negra	San Francisco de Asis	Bambamarca	Hualgayoc	3630	06°43.172'	078°22.570'
UNACO-174	rosada	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3260	06°42.661'	078°33.895'
UNACO-177	shillica negra	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3263	06°42.661'	078°33.895'
UNACO-178	mulla	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3264	06°42.661'	078°33.895'
UNACO-179	imperial	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3265	06°42.661'	078°33.895'
UNACO-180	sumbatina amarilla	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3266	06°42.661'	078°33.895'
UNACO-181	imperial	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3228	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-183	imperial	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3230	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-184	blanca limeña	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3231	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-185	purpura	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3232	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-186	chaucha	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3233	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-187	antuca	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3234	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-188	colerina	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3235	06°42.766'	078°33.991'

Continuación del Cuadro 1.

Entrada	Variedad	Localidad	Distrito	Provincia	Altitud	Latitud	Longitud
UNACO-190	mulla colorada	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3237	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-191	mulla	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3238	06°42.766'	078°33.991'
UNACO-192	mulla colorada	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3325	06°42.668'	078°34.254'
UNACO-193	sapalla	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3326	06°42.668'	078°34.254'
UNACO-195	chaucha	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3328	06°42.668'	078°34.254'
UNACO-196	antuca	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3329	06°42.668'	078°34.254'
UNACO-197	pimpinela	Apan Bajo	Bambamarca	Hualgayoc	3326	06°42.668'	078°34.254'
UNACO-199	negra	Puquio	Socota	Cutervo	2497	06°17.535'	078°39.883'
UNACO-201	rosada	Puquio	Socota	Cutervo	2499	06°17.535'	078°39.883'
UNACO-202	rosada	Puquio	Socota	Cutervo	2500	06°17.535'	078°39.883'
UNACO-203	serrina	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3590	07°10.367'	078°07.345'
UNACO-204	huayta	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3591	07°10.367'	078°07.345'
UNACO-205	oca zapalla	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3402	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-206	chaucha negra	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3403	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-207	bandina amarilla	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3404	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-208	oca huayta	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3405	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-209	oca piña	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3406	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-210	oca anteada	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3407	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-211	oca blanca	Muyoc	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3408	07°10.657'	078°07.306'
UNACO-212	chaucha	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3893	07°13.734'	078°12.385'
UNACO-213	huayta	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3894	07°13.734'	078°12.385'
UNACO-214	pipi de mono	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3895	07°13.734'	078°12.385'
UNACO-215	Jusho	Carbón Alto	Gregorio Pita Paucamarca	San Marcos	3895	07°13.734'	078°12.385'

3.3. Metodología

3.3.1. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica consistió en la siembra sistemática de un máximo de 5 tubérculos por cada accesión agrupados por color. La toma de datos se realizó en base a los descriptores morfológicos propuestos por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 2001). Se efectuó la caracterización morfológica utilizando 35 descriptores morfológicos, de ellos 27 fueron descriptores cualitativos y 8 descriptores cuantitativos. Los datos fueron registrados en diferentes estados

fenológicos de la planta: en estado de plántula, crecimiento vegetativo, antes y después de la floración y finalmente en la cosecha los tubérculos (Anexo 1).

3.3.2. Caracterización Molecular

3.3.2.1. Extracción de ADN

Para la caracterización molecular el material experimental consistió en hojas jóvenes de las ocas cultivadas, las mismas que fueron llevadas frescas al laboratorio con gránulos de silica gel para evitar su oxidación y pudrición. La extracción del ADN se realizó mediante el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Mediante este método se obtuvieron ADN de buena calidad y concentración (Anexo 2: listado de materiales del laboratorio).

El ADN de oca se obtuvo de la siguiente manera: Se trituró aproximadamente 100 mg de tejido vegetal de cada accesión en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido para lograr la ruptura de las paredes y membranas celulares. Se colocó el tejido vegetal triturado en un microtubo autoclavado de 1,5 ml con 700 µl del detergente catiónico para lograr solubilizar las membranas y formar un complejo con el ADN. El buffer CTAB 2X (contenido: 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8); 100 mM Tris HCl (pH 8), 0.2% de β-mercaptoetanol; junto con el CTAB se añadió EDTA para lograr remover los cationes divalentes como el Magnesio y retardar la acción de las enzimas ADN nucleasas, también se agregó el componente β-mercaptoetanol el cual limita la actividad de enzimas nucleasas mediante la apertura de puentes disulfuro, luego se incubó por 30 minutos a 65°C y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, posterior a esto se recuperó el sobrenadante y se agregó 700 µl de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 para la eliminación de proteínas de la solución con ADN y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante, el cual contiene el complejo ADN – CTAB, se transfirió a un microtubo limpio al cual se le agregó un volumen 500 µl de isopropanol helado se mezcló por inversión y luego se colocó la mezcla a una temperatura de -20°C por aproximadamente 40 minutos con la finalidad de precipitar el ADN.

Pasado ese tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos para después desechar la fase acuosa. Se lavó y se centrifugó el pellet de ADN sucesivamente con etanol al 70 por ciento y 95 por ciento. Se dejó secar al aire libre toda la noche y luego se resuspendió en 80 μ l de solución de T₁₀E₁ buffer (Tris (hidroximetil) aminoetano 10mM y EDTA 1mM). Por último se agregó la enzima RNAsa y se incubó por un periodo de 4 horas a una temperatura de 37°C. El protocolo de extracción de ADN según el método de CTAB se puede encontrar en el anexo 3.

3.3.2.2. Determinación de la Calidad y Concentración de ADN

La determinación de la calidad y la concentración del ADN extraído se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 por ciento (p/v) en buffer TBE 1X, se cargó aproximadamente 2 μ l de ADN de cada muestra con 8 μ l de SALB 1X y se sometió a una electroforesis a 90V por 60 minutos (Anexo 4), para la cuantificación de la concentración de las bandas de ADN se utilizó un marcador de peso molecular que en este caso fue el Fago Lambda cortado con la enzima PstI el cual migra dentro del gel y permite comparar las bandas obtenidas de cada una de las muestras con las distintas bandas que produce el marcador, cuya primera banda mide 14800 pares de bases y su intensidad corresponde a una concentración de 280ng/ μ l. Este método de determinación de la concentración del ADN se basa en comparar el grosor y la intensidad de la banda que se produce a través de la fluorescencia producida por el complejo bromuro de etidio-ADN y visualizada mediante el uso de luz ultravioleta. El bromuro de etidio se intercala entre las bases apiladas del ADN y cada banda revela la presencia de una población de moléculas de ADN que poseen un tamaño específico. Se estimó que una adecuada calidad e integridad del ADN genómico correspondía a bandas de ADN sin degradación. Posteriormente se realizó una dilución del ADN de cada accesión hasta alcanzar una concentración final de 50 ng/ μ l, concentración recomendada por Vos *et al.*, (1995) con la que se trabaja para los marcadores AFLP (Figura 3).

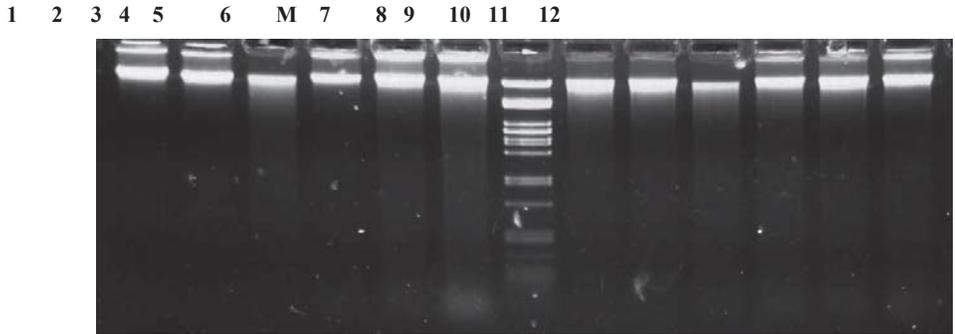


Figura 3: Gel de agarosa al 1% en donde se muestra la calidad de ADN de 12 accesiones de ocas y marcador lambda (M) digerido con la enzima PstI

3.3.2.3. Obtención de marcadores AFLP

Los marcadores AFLP fueron generados siguiendo el procedimiento descrito por Vos *et al.*, (1995), con algunas modificaciones, para optimizar la cantidad de reactivos. En este análisis, se utilizó el método no radioactivo.

La técnica constó de cuatro pasos a seguir:

a. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción

La digestión del ADN de oca se realizó con dos enzimas de restricción, una de corte raro y otra de corte frecuente, con dicha digestión secuencial se generaron tres clases de fragmentos que difieren en las extremidades. Estas enzimas fueron EcoRI y MseI, y se ligaron con sus respectivos adaptadores. La reacción de digestión empleada se muestra en el cuadro 2:

Cuadro 2: Condiciones para la reacción de digestión de ADN de oca cultivada

Soluciones de Trabajo	[l Final
Buffer NEB #2	1X
BSA 10X	1X
EcoRI NEB	20U
MseI NEB	5U
AND muestra	250ng
Agua grado Molecular	Csp
Volumen Final	10 µl

Luego se incubaron las muestras a una temperatura de 37°C por un periodo de 4 horas. El resultado de la digestión se evidenció cargando 5 µl de la muestra de ADN digerida en un gel de agarosa al 1 por ciento. Se observó un arrastre a lo largo de la corrida de un color tenue. En la figura 4 se observa un esquema representativo de la reacción de digestión.

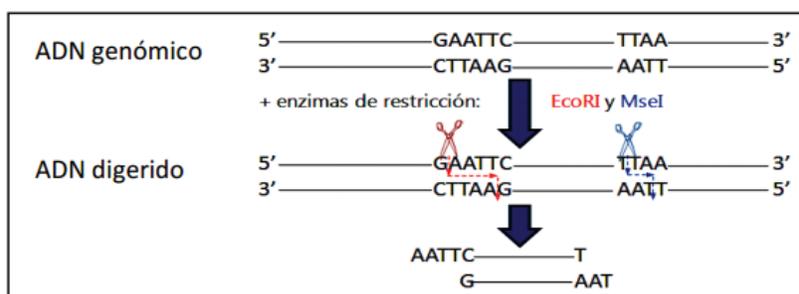


Figura 4: Esquema de digestión de ADN genómico con enzimas de restricción EcoRI y MseI

Se muestra el sitio de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción EcoRI y MseI, y los extremos cohesivos de los fragmentos generados

b. Ligación

Se ligaron los adaptadores que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción. La reacción de ligación se muestra en el cuadro 3:

Cuadro 3: Condiciones para la reacción de ligación de ADN de oca cultivada

Soluciones de trabajo	Final
Buffer ligasa NEB 10X	1.25 X
Adaptador de EcoRI 1+2	1mM
Adaptador de MseI 1+2	1mM
Ligasa T4 NEB	120U
Agua grado Molecular	Csp
Volumen Total	5 µl

Luego, se dejó a temperatura ambiente por 16 horas. Finalmente, se diluyeron las muestras digeridas y ligadas en una proporción de 1 en 5. En la figura 5 se observa un esquema representativo de la reacción de ligación.

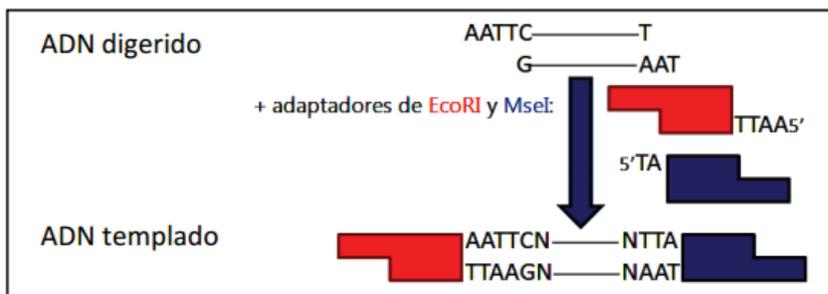


Figura 5: Esquema de ligación de ADN con adaptadores de las enzimas de restricción

La ligación de adaptadores a los extremos cohesivos del ADN digerido genera fragmentos de ADN templado con extremos de secuencias conocidas

c. Pre-amplificación de los fragmentos del ADN digeridos y ligados

En la reacción de pre amplificación, los iniciadores utilizados no contienen ningún nucleótido arbitrario adicional. Las condiciones para la reacción de pre amplificación se muestra en el cuadro 4:

Cuadro 4: Condiciones para la reacción de pre amplificación de ADN de oca cultivada

Soluciones de trabajo	[] Final
Taq polimerasa (Fermentas)	0.5U
Buffer Taq 10X	1.25X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	0.3mM
EcoRI + 0	0.5 μM
MseI + 0	0.5 μM
ADN muestra	100 ng
Agua grado Molecular	Csp
Volumen Total	20 μl

El programa de PCR utilizado en el termociclador Peqstar (PeqLAB) fue el siguiente:

- 1: 72°C por 2min.
 - 2: 94°C por 4min.
 - 3: 94°C por 30seg.
 - 4: 56°C por 1min.
 - 5: 72°C por 1 min.
 - 6: 72°C por 5min.
 - 7: 4°C x ∞
- } Repetir 22 ciclos

Finalmente se diluyó el producto de pre amplificación en una proporción de 1 en 4 con agua ultrapura o libre de nucleasas y fue almacenado a -10° C para su posterior utilización en las amplificaciones selectivas. En la figura 6 se observa un esquema representativo de la reacción de pre-amplificación.

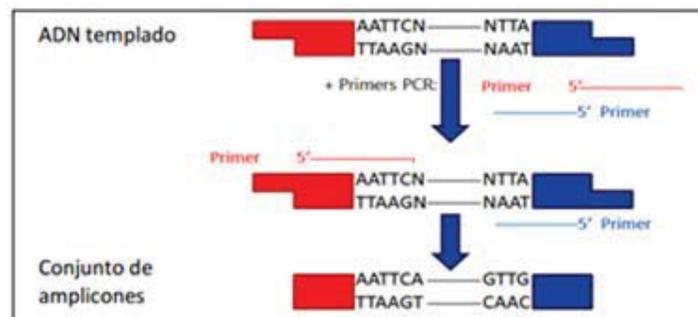


Figura 6: Esquema de reacción de PCR de pre-amplificación del ADN templado.

Se colocan las combinaciones de iniciadores sin ningún nucleótido adicional para iniciar la amplificación pre-selectiva del ADN

d. Amplificación selectiva

Esta etapa es la de mayor intensidad de selección, los iniciadores utilizados poseen hasta tres nucleótidos arbitrarios adicionales, con lo que la amplificación se hará más selectiva. La especificidad de esta unión es determinada por el número de nucleótidos selectivos que posea el iniciador AFLP. La reacción de amplificación selectiva empleada se muestra en el cuadro 5:

Cuadro 5: Condiciones para la reacción de amplificación selectiva de ADN de oca cultivada

Soluciones de trabajo	[] Final
Taq polimerasa (Fermentas)	0.5U
Buffer Taq 10X	1.1X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	0.3 mM
EcoRI + 3	2 μM
MseI + 3	0.3 μM
ADN pre-amplificado	2 μl
Agua grado Molecular	Csp
Volumen Total	10 μl

El programa de PCR utilizado en el termociclador Peqstar (PeqLAB) fue el siguiente:

- 1: 94 °C x 4min.
 - 2: 94°C x 20seg.
 - 3: 65 °C x 30seg.
 - 4: 72 °C x 2 min.
 - 5: 94 °C x20 seg.
 - 6: 65°C X 30seg. bajando 1°C por ciclo
 - 7: 72°C 2 min
 - 8: 94°C x20seg.
 - 9: 56°C 30 seg.
 - 10: 72°C 2 min.
 - 11: 60°C x 30 min.
 - 12: 4°C x ∞
-

Luego, el producto amplificado fue almacenado a 4 °C hasta la electroforesis en geles de poliacrilamida al 4 por ciento. En la figura 7 observa un esquema representativo de la reacción de amplificación selectiva.

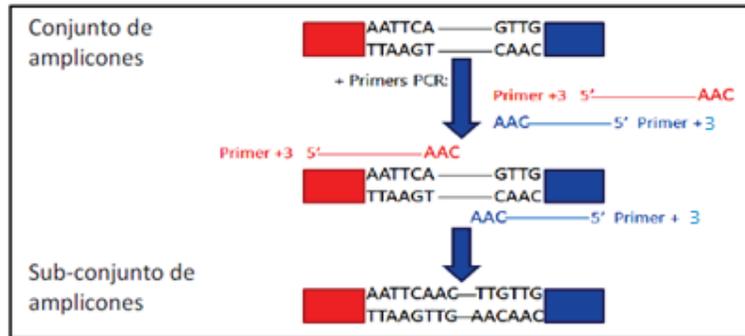


Figura 7: Esquema de reacción de amplificación selectiva del ADN templado.

Se colocan las combinaciones de iniciadores con tres nucleótidos adicionales (EcoRI +3/ MseI + 3) para iniciar la amplificación selectiva del ADN

3.3.2.4. Selección de iniciadores de combinaciones de AFLP

Con la finalidad de seleccionar los iniciadores más polimórficos, con mayor información y mejor intensidad y nitidez de banda; se realizó inicialmente, un tamizado en 8 accesiones de oca elegidas al azar con 12 iniciadores diferentes (data no mostrada). Con esos criterios se seleccionaron las 6 combinaciones de iniciadores que se utilizaron para la evaluación de todas las accesiones que se muestran en el cuadro 6. En la Figura 8 se muestra el tamizado de las 6 combinaciones de iniciadores elegidas para el total de las accesiones estudiadas.

Cuadro 6: Estructura de la secuencia de los iniciadores AFLP seleccionados para accesiones de oca cultivadas de la región Cajamarca

Nº	Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
1	E45	5-GAC TGC GTA CCA ATT C AT G-3	M35	5-GAT GAG TCC TGA GTA A AC A-3
2	E32	5-GAC TGC GTA CCA ATT C AA C-3	M59	5-GAT GAG TCC TGA GTA A AT A-3
3	E40	5-GAC TGC GTA CCA ATT C AG C-3	M35	5-GAT GAG TCC TGA GTA A AC A-3
4	E40	5-GAC TGC GTA CCA ATT C AG C-3	M50	5-GAT GAG TCC TGA GTA A CA T-3
5	E35	5-GAC TGC GTA CCA ATT C AC A-3	M59	5-GAT GAG TCC TGA GTA A AT A-3
6	E45	5-GAC TGC GTA CCA ATT C AT G-3	M59	5-GAT GAG TCC TGA GTA A AT A-3

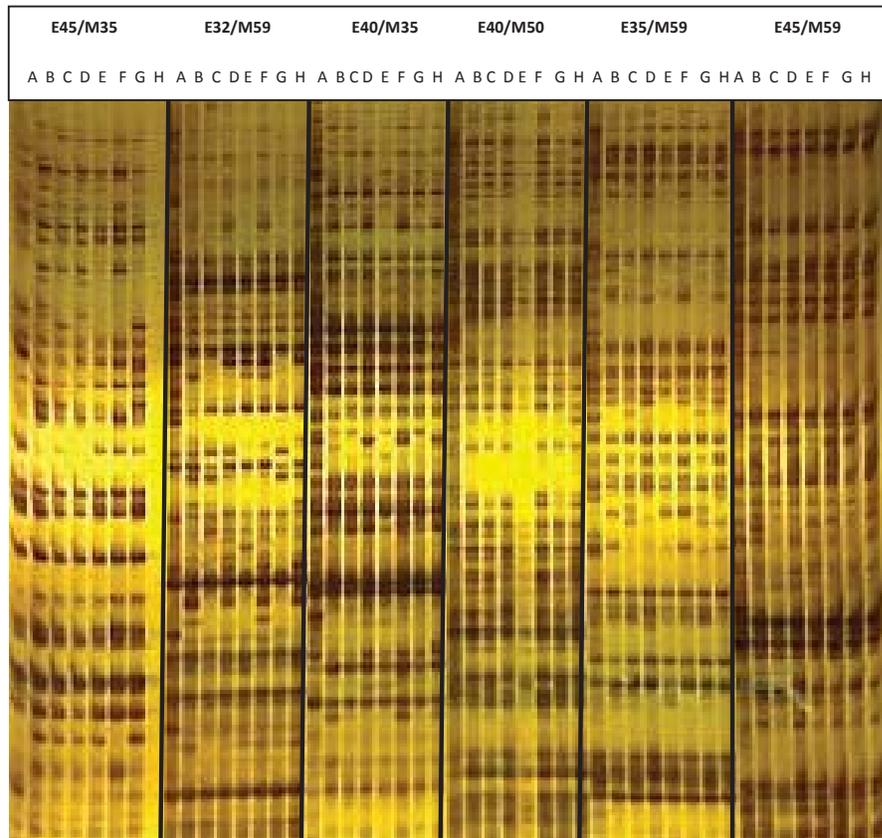


Figura 8: Tamizado de iniciadores AFLP utilizando 8 accesiones de oca cultivadas

3.3.2.5. Electroforesis del producto amplificado AFLP

Los productos de la amplificación selectiva fueron separados con un equipo de electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 por ciento y urea 5M, con un espesor de 0.4 mm. Al producto de amplificación se le agregó 5µl de tampón de carga para geles de poliacrilamida (Formamida 96 por ciento v/v, 10 mM EDTA pH 8.9, azul de bromofenol 0.05 p/v y xilencianol 0.05 p/v). Posteriormente, las muestras fueron denaturadas a 95°C por 5 minutos.

Inmediatamente después, se cargaron de 5 a 6 µl de las mismas, en el gel de poliacrilamida. El tiempo de corrida, dependió del voltaje aplicado, así como el tamaño de los fragmentos esperados. Se trabajó con dos opciones: corridas electroforéticas de 4 horas a 1600 V o toda la noche a 350 V, según la disponibilidad

de los equipos. La preparación de los geles de poliacrilamida se encuentra en el Anexo 5.

3.3.2.6. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida

La tinción y revelado de los geles de poliacrilamida se hizo basándose en los protocolos de Bassam *et al.* (1991), con algunas modificaciones que se describen a continuación. Al finalizar la electroforesis, el aparato fue desmontado, el vidrio con el gel adherido se separó de la cámara y se colocó en una solución de ácido acético al 10 por ciento durante 20 minutos para la fijación del ADN. Luego se retiró el exceso de ácido con agua destilada. En seguida para la tinción, se colocó el gel en una solución que contiene nitrato de plata (1g/l) por 30 minutos. Finalizado este tiempo, inmediatamente se lavó el gel con agua destilada durante 6 segundos. Posteriormente se revelaron los productos de PCR con una solución que contiene: carbonato de sodio (30 g/l), formaldehído al 0.05 por ciento y tiosulfato de sodio (2mg/l) hasta la visualización de las bandas. Para detener la reacción de la solución reveladora, el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante diez minutos y finalmente se lavó con agua destilada.

3.3.2.7. Detección de marcadores AFLP

Para la detección de la electroforesis en los geles de poliacrilamida de los productos amplificados se utilizó el método de tinción con nitrato de plata. La metodología está basada en la reducción del nitrato de plata por el formaldehído, en un medio básico (pH=12) proporcionado por la solución de carbonato de sodio. Los iones de Ag^+ son reducidos a plata metálica (Ag^0) solamente en la presencia de una biomolécula, como ADN, formando un complejo visible.

3.4. Análisis estadístico

3.4.1. Análisis de datos

La lectura de las bandas se realizó con un transiluminador de luz blanca. Se leyeron las bandas con mejor resolución y se enumeraron consecutivamente empezando desde el primer individuo del primer carril, cada banda de ADN fue considerada como un locus individual, con dos posibles alelos, a la presencia de banda se le asignó un “1” y a las ausencias se le asignó un “0”, los datos faltantes, dudosos o perdidos fueron registrados con un “9”.

3.4.2. Caracterización Molecular

3.4.2.1. Selección del coeficiente de similitud

La similitud genética entre individuos puede calcularse por varios procedimientos. En el caso de datos binarios como los obtenidos por los marcadores AFLP, algunos coeficientes de similitud más usados son el coeficiente de Dice (Nei y Li, 1979), el coeficiente de Jaccard (1908) y el coeficiente de Similitud de Emparejamiento Simple (en inglés, *Simple Matching coefficient*, o simplemente, *SM*) (Sokal y Michener, 1958).

En este caso el coeficiente de similitud se estimó calculando el coeficiente de SM, para estos cálculos se utilizó el programa NTSYS pc 2.2 Sistema de Análisis Multivariado de taxonómica Numérica (Rohlf 2001).

A continuación se detalla la fórmula del Coeficiente de Similitud SM:

$$S_{ij} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Dónde:

- S_{ij} = Similitud entre los individuos i y j
- a = Numero de pares (1,1)
- b = Numero de pares (1,0)
- c = Numero de pares (0,1)
- d = Numero de pares (0,0)

El coeficiente SM proporciona igual valor tanto a las ausencias como a las presencias de los marcadores.

3.4.2.2. Análisis de agrupamiento

Los dendogramas se elaboraron siguiendo el algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic means*) de la opción SAHN (*Sequential agglomerative hierarchical nested cluster analysis*) del programa NTSYS (Rohlf, 2001).

UPGMA es un método basado en distancias genéticas, la distancia se expresa como la fracción de sitios que difieren entre dos secuencias en un apareamiento múltiple. Así, que la suposición que a mayor tiempo transcurrido de divergencia a partir de un ancestro común, más diferirán las secuencias es razonable, pero no siempre es verdadera. El método UPGMA así como el método de *Neighbor Joining* (NJ) generan una matriz de distancia, calculado para cada par de taxa (entrada) la distancia, o la fracción de distancias entre dos secuencias.

3.4.2.3. Índice de contenido polimórfico (PIC)

El valor de PIC de un marcador es definido como la fracción informativa esperada de la descendencia de un tipo de pedigree. La informatividad del marcador puede ser medida cuantitativamente mediante la siguiente formula:

$$1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n p_i^4$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo marcado y n el número de alelos diferentes, para el caso de AFLP esto es $n = 2$. Es decir para determinar el valor de PIC primero se debió determinar la frecuencia de cada alelo (Hildebrant *et al.*, 1992)

3.4.2.4. Análisis de Varianza Molecular

Se calculó y analizó la varianza de las frecuencias génicas dentro y entre poblaciones de oca usando el análisis de varianza molecular (AMOVA) incluido en el programa Arlequín 3.1. (Excoffier *et al.*, 2010)

En AMOVA se divide la varianza total en términos de covarianza (Excoffier *et al.*, 1992): entre grupos (σ^2_a), entre poblaciones dentro de grupos (σ^2_b) y dentro de poblaciones (σ^2_c). La varianza total se calcula de la siguiente manera:

$$\sigma^2_t = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$$

Dichas covarianzas están generadas a partir de la suma de desviaciones de cuadrados (SSD) divididas entre sus grados de libertad (caso de covarianza σ^2_c) u otros factores corregidos (demás covarianzas que tienen un factor de corrección “n”). La suma de estas nos dará la varianza total. La SSD a su vez se deriva de las diferencias o mutaciones entre individuos provenientes de diferentes categorías (entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones). Las covarianzas dependen básicamente de las diferencias o mutaciones entre individuos.

Al momento de definir grupos de poblaciones, lo que se está definiendo en una estructura genética particular que será evaluada, en este sentido para la presente investigación se realizó el agrupamiento de las ocas cultivadas por provincias de donde provenían.

3.4.3. Caracterización Morfológica

Se calcularon los datos estadísticos de cada accesión (valor máximo, valor mínimo, media, moda, varianza, desviación estándar, rango, y coeficiente de variación) de los caracteres cuantitativos evaluados, así como también se calcularon las frecuencias de los caracteres cualitativos por cada accesión evaluada en el software Microsoft Excel 2010. Se realizó el análisis de conglomerados con el método UPGMA y, con la matriz de distancias, se construyó el dendograma correspondiente mediante el software NTSYS pc 2.2. (Rohlf, 2001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización morfológica

4.1.1. Descriptores morfológicos cuantitativos

Al evaluar la colección de ocas cultivadas se encontró una notable variabilidad morfológica, la misma que se caracterizó e identificó mediante el agrupamiento en base al tipo y la procedencia de los diferentes individuos con los cuales se trabajó, estos estudios son una herramienta útil para los programas de mejoramiento y conservación que en los últimos años han tomado un gran auge.

El comportamiento promedio de las variables cuantitativas para la región Cajamarca mostró un valor de 25.6 ± 6.3 (media \pm desviación estándar) para la variables altura de planta, 2.0 ± 0.3 para largo de foliolos, 2.6 ± 0.4 para ancho de foliolos, 6.1 ± 1.2 para largo de peciolos, 7.9 ± 1.9 para diámetro de tallo, 4.7 ± 1.5 para número de tallos y en cuanto a datos cuantitativos del tubérculo el comportamiento promedio arrojó un valor de 2.4 ± 0.4 para ancho del tubérculo y 6.6 ± 1.9 para largo de tubérculo.

En cuanto al comportamiento promedio de las variables cuantitativas de las provincias estudiadas, estas arrojaron un mayor valor para las entradas de la provincia de San Marcos en las variables altura de planta ($27,5 \text{ cm} \pm 6,1$) y número de tallos ($5 \pm 1,5$), mientras que para Cutervo los mayores valores se tienen en las variables diámetro de tallo de la planta ($9,0 \text{ cm} \pm 1$), ancho del tubérculo ($2,6 \text{ cm} \pm 0,4$) y largo del tubérculo ($7,5 \text{ cm} \pm 1,8$). Celendín, Chota y Hualgayoc presentan valores promedio iguales para las variables largo de foliolos ($2,1 \text{ cm}$), ancho de foliolos ($2,7 \text{ cm}$) y largo de peciolos ($6,5 \text{ cm}$). Para la provincia de Cajabamba el mayor valor se observa en la variable largo de tubérculo ($7.2 \text{ cm} \pm 2$). En la provincia de Cajamarca se observa el menor valor para altura de planta ($22,7 \pm 5,9$), largo de foliolos ($1,8 \pm$

0,2), ancho de foliolos ($2,3 \pm 0,3$) y largo del tubérculo ($2,3 \pm 2,1$). Los descriptores cuantitativos se muestran en el anexo 7

4.1.2. Descriptores morfológicos cualitativos

En las ocas cultivadas de la región Cajamarca se encontró que el color de tallo aéreo que predomina para las accesiones estudiadas es el rojo grisáceo (32,6%), seguido del color verde amarillento (29%), purpura rojizo (21%), verde grisáceo predominante con rojo grisáceo (13,8%) y finalmente el purpura grisáceo (3,6%). Para la variable pigmentación de la axila se encontró que la mayoría de las plantas no presentaba coloración (74,6%), mientras que para la variable color de follaje el color que predominó fue el verde amarillento oscuro con purpura grisáceo (44,2%), el color del envés de foliolo que predominó fue el verde amarillento (60,6%), el color del peciolo que predominó fue verde con estipulas purpura grisáceo (38,4%), el hábito de floración es escasa (38,4%) y sólo el 15,9% tiene un hábito de floración abundante. El tipo de planta que predominó fue procumbente (98,6%) frente al tipo erecto, la forma de planta que predominó fue la forma esférica (50,7%) frente a la formas laxa (47,1%) y cilíndrica (2,2%). El 100% de las entradas no presentó virus y presentaron un hábito de floración tardío (73,2%).

En cuanto a las variables cualitativas evaluadas para tubérculo para las ocas de la región Cajamarca, se tiene que el color de la superficie de tubérculo que predominó fue el naranja amarillento (25,4%) seguido por el color amarillo (20,3%) y purpura grisáceo claro (11,6%). El color secundario de la superficie de tubérculo está ausente para el 29% de la población y el que predominó fue el color rojo (19,6%) seguido por el purpura rojizo (13,8). La mayoría de ocas presentó una distribución del color secundario de la superficie del tubérculo alrededor de los ojos (23,9%), el color de pulpa que predominó fue el amarillo (44,9%) seguido por el color naranja amarillento (35,5%). El 53,6 % de ocas no presentó color secundario de pulpa, sin embargo el 13% presentó un color de pulpa secundario rojo. En cuanto a la forma del tubérculo predominaron las formas claviformes (57,2%) seguida por las formas ovoides (24,6%). El 7,2% de ocas presentaron fasciación y el 65% de estas presentaron formas de yemas horizontales superficiales, se observó la presencia de quimera en

una entrada del total lo que representa menos del 1% y en el total de las entradas la superficie de la piel fue lisa. Se realizaron diagramas de torta para cada descriptor cualitativo del total de las accesiones de la región Cajamarca, esto se muestra en el anexo 8.

4.1.3. Dendograma de caracterización morfológica

M1

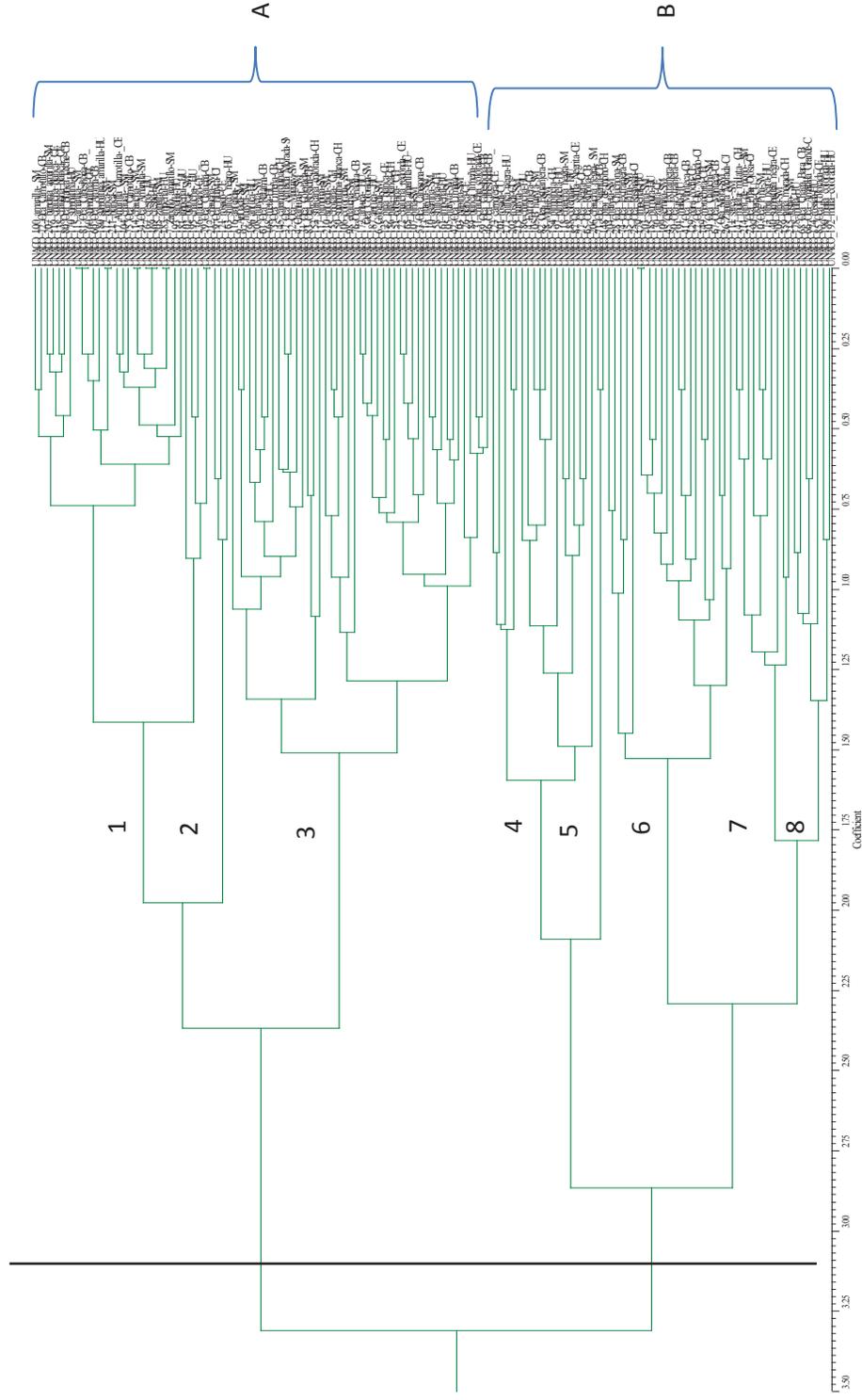


Figura 9: Dendograma de caracterización morfológica utilizando los marcadores morfológicos cualitativos para 138 accesiones de oca cultivada de la región de Cajamarca

Sobre la base de los resultados obtenidos en el dendograma de caracterización morfológica fue posible agrupar 138 accesiones de *O. tuberosa* evaluadas morfológicamente provenientes de la región Cajamarca en 129 grupos morfológicamente diferentes que se separan principalmente por la forma, color de piel y color de pulpa del tubérculo. El porcentaje de duplicación observado para la colección de ocas cultivadas en estudio es de 6.5 por ciento. En el cuadro 7 se observa las accesiones que conforman los morfotipos duplicados encontrados.

Cuadro7: Accesiones de morfotipos duplicados

Morfotipo	Accesión	Provincia	Color predominante del tubérculo
M8	UNACO-115	San Marcos	Amarillo
	UNACO-081	Cajabamba	
	UNACO-160	Chota	
M11	UNACO -112	San Marcos	Blanco amarillento
	UNACO -211	San Marcos	
M15	UNACO-114	San Marcos	Naranja amarillento
	UNACO-034	San Marcos	
M16	UNACO-167	Hualgayoc	Naranja amarillento
	UNACO-169	Hualgayoc	
	UNACO-205	San Marcos	
M17	UNACO-183	Hualgayoc	Naranja amarillento
	UNACO-007	San Marcos	
M23	UNACO-079	Cajabamba	Naranja amarillento
	UNACO-212	San Marcos	
M97	UNACO-179	Hualgayoc	Amarillo
	UNACO-203	San Marcos	

Tomando como referencia un coeficiente de disimilitud de aproximadamente 2.9 se observó la formación de dos grandes grupos. El primer grupo (A) está representado por tubérculos de color blanco amarillento (5.1 %), amarillo (21.5 %), naranja amarillento (41.8%), rojo naranja (10.1 %), rojo naranja oscuro (3.8%), rosado (8.9%), rojo pálido (1.3%), rojo (2.5%), purpura rojizo (2.5%) y purpura grisáceo claro (2.5%). En cuanto al color secundario del tubérculo el 41.8% presentó ausencia de este y el color que predominó fue el rojo con una frecuencia del 13.9% en el total del grupo. Además el color principal de pulpa que predominó fue el naranja

amarillento (50.6%), seguido del color amarillo (43.0%). Este primer grupo presentó una notable ausencia del color secundario de pulpa del tubérculo (93.7%) y los colores que predominaron fueron el amarillo (2.5%) y el naranja amarillento (3.8%). Las forma de tubérculo que predominó fue la forma claviforme (59.5%) seguida de la forma ovoide (20.3%) y en menor medida las formas cilíndricas (12.7%) y alargadas (7.6%). El 11.4% de ocas presentan fasciación, y se encuentra en este grupo la única accesión en donde se observó la presencia de quimera (UNACO-113).

A un coeficiente de disimilitud de 1.75, el grupo A se divide en 3 subgrupos bien definidos (S1, S2 y S3). El primer subgrupo S1 se diferencia básicamente en la coloración primaria del tubérculo, se encuentran tonalidades desde el blanco amarillento hasta el naranja amarillento además de no presentar color secundario en el tubérculo. En cuanto al color secundario de la pulpa también se puede observar que este grupo presenta tonalidad de pulpa desde el blanco amarillento hasta el naranja amarillento con una notable ausencia del color secundario de la pulpa en la mayoría de las accesiones. A un coeficiente de disimilitud de aproximadamente 0.85 se pueden notar accesiones (UNACO-102, UNACO-195, UNACO-136, UNACO-079, UNACO-212) que presentan color secundario de la pulpa de color amarillo y naranja amarillento por lo que se diferencian del resto de accesiones de este primer subgrupo. El subgrupo S2, solo está representado por 3 accesiones en donde la principal característica es la notable ausencia de color secundario de la pulpa del tubérculo. En el subgrupo S3, el color primario del tubérculo varía desde el blanco amarillento hasta el purpura grisáceo claro, lo que sugiere que este descriptor cualitativo no es criterio de diferenciación para este grupo. Todas las accesiones presentan color secundario del tubérculo que varía desde el color amarillo hasta el purpura grisáceo. El color primario de pulpa varía desde el blanco hasta el naranja amarillento y se observa una notoria ausencia del color secundario de la pulpa, lo que sugiere que es un criterio de clasificación para este grupo.

En el cuadro 8 se muestran las accesiones de oca cultivadas de cada subgrupo descrito, la provincia a donde pertenecen y el color predominante del tubérculo.

Cuadro 8: Accesiones de ocas cultivadas que pertenecen al grupo A

Grupo	Sub	Características	Accesiones	Provincia
A	1	Según la provincia se distribuyen	U-017, U-060, U-072, U-075, U-079, U-080-U-081	Cajabamba (22.58%)
			U-119, U-136, U-138	Celendín (9.68%)
			U-160	Chota (3.23%)
			U-167, U-169, U-170, U-180, U-181, U-183, U-193, U-195	Hualgayoc (25.81%)
			U-007,U-034, U-100, U-102, U 104, U-112, U-114, U-115, U-205, U-207, U-211, U-212	San Marcos (38.71%)
			Accesiones	Color
		Según el color predominante de la superficie del tubérculo	U-112, U-211	Blanco amarillento (6.5%)
			U-115, U-138, U-060, U-080, U-081, U-160, U-180, U-102	Amarillo (25.8%)
			U-100, U-017, U-207, U-104, U-114, U-119, U-167, U-169, U-181, U-034, U-072, U-075, U-193, U-170, U-205, U-007, U-183, U-195, U-136, U-079, U-212	naranja amarillento (67.7%)
	Sub	Características	Accesiones	Provincia
	2	Según la provincia se distribuyen	U-019	Cajamarca (33.3%)
			U-121	Celendín (33.3%)
			U-163	Hualgayoc (33.3%)
			Accesiones	Color
		Según el color predominante de la superficie del tubérculo	U-019, U-121	Púrpura rojizo (66.7%)
			U-163	Púrpura grisáceo claro (33.3%)
	Sub	Características	Accesiones	Provincia
	3	Según la provincia se distribuyen	U-046, U-059, U-053, U-042, U-073, U-061, U-083, U-076	Cajabamba (17.8%)
			U-126, U-131, U-122, U-125	Celendín (8.9%)
			U-145, U-155, U-151, U-156, U-158, U-153, U-150	Chota (15.6%)
			U-172, U-187, U-196, U-184, U-161, U-165, U-168	Hualgayoc (15.6%)
			U-116, U-210, U-009, U-110, U-004, U-098, U-006, U-106, U-097, U-113, U-208, U-037, U-001, U-031, U-032, U-103, U-117, U-107, U-105	San Marcos (42.2%)
		Accesiones	Color	
Según el color predominante de la superficie del tubérculo		U-046, U-076	Blanco amarillento (4.4%)	
		U-110, U-126, U-184, U-098, U-161, U-059, U-053, U-103, U-125	Amarillo (20.0%)	
		U-116, U-131, U-122, U-155, U-151, U-106, U-042, U-107, U-165, U-156, U-158, U-105	naranja amarillento (26.7%)	
		U-172, U-187, U-006, U-113, U-001, U-031, U-073, U-150	Rojo naranja (17.8%)	
		U-210, U-208, U-168	Rojo naranja oscuro (6.7%)	
		U-196, U-145, U-037, U-004, U-032, U-061, U-153	Rojo claro (15.6%)	
		U-083	Rojo pálido (2.2%)	
		U-009, U-097	Rojo (4.4%)	
		U-117	Púrpura grisáceo claro (2.2%)	

El segundo grupo B está representado por tubérculos de color blanco amarillento (11.9 %), amarillo (18.6 %), naranja amarillento (3.4%), rojo naranja (1.7% %), rojo naranja oscuro (1.7%%), rosado (1.7%), rojo pálido (11.9%), rojo (5.1%), púrpura rojizo (10.2%), púrpura grisáceo claro (23.7%), púrpura grisáceo oscuro (5.1%) y púrpura grisáceo (5.1%), este último color de tubérculo no está incluido dentro de la IPGRI, sin embargo se consideró este estado del descriptor para este estudio al momento de la comparación morfológica.

En cuanto al color secundario del tubérculo sólo el 11.9% presentó ausencia de este y el color que predominó fue también el rojo (27.1%), seguido del color púrpura rojizo (22.0%) y amarillo (8.5%). Además el color principal de pulpa que predominó fue el amarillo (47.5%), seguido del color blanco (18.6%) y los colores blanco amarillento y naranja amarillento en menor medida (15.3%). En este grupo ninguna accesión presentó ausencia del color secundario de pulpa del tubérculo y los colores que predominaron fueron el rojo (30.5%), el púrpura rojizo y púrpura grisáceo (20.3%). Las forma de tubérculo que predominó fue nuevamente la forma claviforme (54.2%) seguida de la forma ovoide (30.5%) y en menor medida las formas cilíndricas (8.5%) y alargadas (6.8%). Sólo el 1.7% de ocas en este grupo presentan fasciación.

Con un coeficiente de disimilitud de 1.75, el grupo B se divide en 5 subgrupos bien definidos (S1, S2, S3, S4 y S5). El primer subgrupo S1 está representado por tubérculos que van desde el rojo pálido hasta el púrpura grisáceo oscuro. En cuanto al color secundario del tubérculo este varía desde el color blanco al color amarillo. El color principal de pulpa varía desde el blanco hasta el naranja amarillento y en la forma del tubérculo predominan las formas ovoides y claviformes. El subgrupo S2, sólo está representado por 2 accesiones de oca, la piel de los tubérculos es púrpura grisáceo y no presenta color secundario en el tubérculo. El sub grupo S3 presenta tubérculos desde blanco amarillento hasta rojo naranja oscuro. Todos los tubérculos presentan color secundario siendo el color púrpura rojizo el predominante, en cuanto al color de la pulpa esta varía desde el blanco hasta el naranja amarillento y el color secundario varía desde el naranja amarillento hasta el púrpura rojizo, la forma del tubérculo que predomina es la claviforme. En el sub grupo S4, el color predominante del tubérculo es el púrpura grisáceo claro y sólo la entrada UNACO 115 presenta color púrpura grisáceo oscuro. En cuanto al color secundario de

tubérculo todas las entradas presentaron color rojo. En el color predominante de pulpa se presentan los colores blanco y amarillo. Mientras que el color secundario de pulpa se tienen los colores: rojo, púrpura rojizo y púrpura grisáceo. En cuanto a la forma predominante del tubérculo se tienen las formas ovoide y claviforme. Finalmente, en el subgrupo S5 el color de los tubérculos varían desde el rosado hasta el rojo y el color secundario varía desde el rojo grisáceo hasta el púrpura grisáceo, la distribución del color secundario que predomina es alrededor de ojos. El color de pulpa varía desde el blanco amarillento al naranja amarillento, mientras que el color secundario de pulpa varía desde el naranja amarillento hasta el rojo grisáceo. En el Cuadro 9 se muestran las accesiones de oca cultivadas de cada subgrupo descrito, la provincia a donde pertenecen y el color predominante del tubérculo.

En el dendograma mostrado de la caracterización morfológica se puede observar que los diferentes grupos evaluados se formaron sin ninguna relación geográfica, es decir las ocas de las diferentes provincias de Cajamarca estudiadas no necesariamente se agrupaban según su lugar de origen, esto coincide con lo encontrado por Pissard *et al.* (2008), en donde los *clusters* morfológicos hallados no guardaron relación con la estructura geográfica de donde provenían las accesiones estudiadas, es decir las accesiones se agrupaban independientemente del lugar de donde provenían. Esto evidencia el intercambio de variedades por parte de los agricultores a lo largo de las provincias evaluadas para la región Cajamarca. Los trabajos antes realizados (Nagatomy, 2011; Zorrilla, 2006) concuerdan con lo observado en las accesiones descritas de *O. tuberosa* en esta investigación (Figura 10). Todo lo antes mencionado muestra que existe una gran variabilidad en forma, color y tamaño de los tubérculos de oca.

Cuadro 9: Accesiones de ocas cultivadas que pertenecen al grupo B

Grupo	Sub grupo	Características	Accesiones	Provincia	
B	1	Según la provincia se distribuyen	U-014, U-082, U-065	Cajabamba (16.7%)	
			U-027	Cajamarca (5.6%)	
			U-123, U-087	Celendín (11.1%)	
			U-154	Chota (5.6%)	
			U-201, U-202	Cutervo (11.1%)	
			U-186, U-188, U-197, U-177	Hualgayoc (22.2%)	
			U-105, U-118, U-206, U-038, U-213	San Marcos (27.8%)	
			Accesiones	Color	
		Según el color predominante de la superficie del tubérculo	U-197, U-202, U-207	Rojo pálido (16.7%)	
			U-201	Rojo (5.6%)	
			U-105, U-123, U-082, U-038, U-154, U-177	Púrpura rojizo (33.3%)	
			U-186, U-118, U-188, U-014, U-065	Púrpura grisáceo claro (27.8%)	
			U-027, U-206	Púrpura grisáceo oscuro (11.1%)	
	2	Según la provincia se distribuyen	U-087	Púrpura grisáceo (5.6%)	
			U-071	Cajabamba (50.0%)	
		U-148	Chota (50.0%)		
			Accesiones	Color	
	Según el color de la superficie del tubérculo	U-071, U-148	Púrpura grisáceo (100.0%)		
	3	Según la provincia se distribuyen	U-045, U-050, U-074, U-041, U-067	Cajabamba (22.7%)	
			U-022, U-025, U-026	Cajamarca (13.6%)	
			U-129, U-130	Celendín (9.1%)	
			U-149	Chota (4.5%)	
			U-179, U-191, U-185	Hualgayoc (13.6%)	
			U-028, U-204, U-030, U-002, U-035, U-111, U-109, U-203	San Marcos (36.4%)	
			Accesiones	Color	
		Según el color predominante de la superficie del tubérculo	U-041, U-191, U-067, U-002, U-022, U-185, U-026	Blanco amarillento (31.8%)	
			U-179, U-149, U-030, U-050, U-074, U-025, U-129, U-111, U-109, U-203, U-130	Amarillo (50.0%)	
			U-045, U-035	naranja amarillento (9.1%)	
			U-204	Rojo naranja (4.5%)	
			U-028	Rojo naranja oscuro (4.5%)	
		4	Según la provincia se distribuyen	U-023	Cajamarca (10.0%)
				U-140	Celendín (10.0%)
				U-147, U-159	Chota (20.0%)
U-199	Cutervo (10.0%)				
U-173	Hualgayoc (10.0%)				
U-010, U-209, U-214, U-215	San Marcos (40.0%)				
	Accesiones		Color		
Según el color predominante de la superficie del tubérculo	U-010, U-209, U-214, U-173, U-199, U-147, U-159, U-140, U-023		Púrpura grisáceo claro (90.0%)		
U-215	Púrpura grisáceo oscuro (10.0%)				
5	Según la provincia se distribuyen	U-066, U-068	Cajabamba (28.6%)		
		U-085	Celendín (14.3%)		
		U-178, U-190, U-192, U-174	Hualgayoc (57.1%)		
		Color			
	Según el color predominante de la superficie del tubérculo	U-174	Rojo claro (14.3%)		
		U-190, U-066, U-068, U-085	Rojo pálido (57.1%)		
U-178, U-192	Rojo (28.6%)				



Figura 10: Variabilidad de forma, color y tamaño de los tubérculos de oca de la región Cajamarca

4.2. Análisis Molecular

4.2.1. Selección de los iniciadores AFLP

Inicialmente se evaluaron 12 combinaciones de iniciadores diferentes de AFLP en 8 muestras de oca escogidas al azar, de las cuales se escogieron 6 combinaciones de iniciadores por brindar mayor información polimórfica y por su capacidad de resolución de bandas, valores que se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10: Combinaciones de iniciadores AFLP empleados y número de marcadores encontrados en 138 accesiones de oca.

Combinación de Iniciadores	Número de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas	Número total de bandas	% de polimorfismo
E45-M35	35	30	65	46.15
E32-M59	28	40	68	58.82
E40-M35	44	25	69	36.23
E40-M50	29	39	68	58.35
E35-M59	28	29	57	50.88
E45-M59	36	31	67	46.27
TOTAL	200	194	394	49.24

Con las 6 combinaciones de iniciadores utilizados se obtuvieron un total de 394 fragmentos amplificados, de los cuales 194 fueron bandas informativas (49.24% de

polimorfismo), con un promedio de 32.3 bandas informativas por iniciador, este valor fue más alto que el encontrado por Moscoe y Emshwiller (2014) quienes reportaron un promedio de bandas polimórficas de 28.19 por iniciador. La combinación más informativa fue E32-M59, con un total de 68 bandas de las cuales 40 fueron polimórficas. La combinación menos informativa fue E35-M59 con un total de 57 bandas de las cuales sólo 29 bandas fueron informativas. Los datos perdidos no superaron el 0.34 por ciento del total de datos recolectados.

Biondi (2006), encontró valores similares para la combinación E35-M59 con un total de 28 bandas polimórficas y 90 por ciento de polimorfismo y para la combinación E40-M35 reportó un valor de 29 bandas polimórficas con 100 por ciento de polimorfismo, es decir todas las bandas fueron informativas para la colección de ocas cultivadas del Centro Internacional de la papa (CIP). Adrianzen (2007) encontró 19 marcadores polimórficos para la combinación E35-M59 y 20 marcadores polimórficos para la combinación E40-M35 para ocas cultivadas de 4 comunidades de Cuzco. Schibli (2006) reportó un total de 24 bandas polimórficas para la combinación E35-M59 con un porcentaje de polimorfismo de 75 por ciento y 21 bandas polimórficas para la combinación E40-M35 con un porcentaje de polimorfismo de 72.4 por ciento. y un total de 75.6 por ciento de polimorfismo para ocas cultivadas de dos comunidades de Cuzco.

Con la cantidad de bandas informativas encontradas se puede deducir que las muestras analizadas tienen un alto nivel de ploidía, ya que según Moscoe & Emshwiller (2014), a mayor número de copias de ADN (mayor ploidía) mayor es el número de bandas informativas obtenidas con los marcadores moleculares.

Además se calculó el porcentaje de fragmentos polimórficos en las 7 provincias evaluadas de la región Cajamarca, valores que se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11: Número y porcentaje de fragmentos polimórficos encontrados en las 7 provincias evaluadas de la región Cajamarca

Provincia	N° de fragmentos polimórficos	Porcentaje de fragmentos polimórficos
Cajabamba	174	89.69
Cajamarca	147	75.77
Celendín	177	91.24
Chota	165	85.05
Cutervo	100	51.55
Hualgayoc	189	97.42
San Marcos	187	96.39
Total	194	100.00

Los porcentajes de los fragmentos polimórficos encontrados en cada una de las provincias evaluadas indican una diferenciación entre ellas, sobre todo para la provincia de Cutervo en donde el porcentaje de polimorfismo encontrado es de 51.55 por ciento lo que indicaría la poca variabilidad genética de las ocas cultivadas en este lugar. Por otro lado el mayor porcentaje de fragmento polimórfico encontrado pertenece a Hualgayoc (97.42%) lo que indicaría mayor variabilidad genética para esta provincia.

4.2.2. Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

Haciendo uso de los datos de la matriz binaria de presencias (1) y ausencias (0), se estimó el contenido de información polimórfica (PIC) por combinación de iniciadores de AFLP. En el cuadro 12 se muestra los valores de PIC por combinación de iniciadores y por provincia.

Cuadro 12: Valores de PIC para provincias de la región Cajamarca y por combinación de iniciadores AFLP

Combinación AFLP	PIC							Total
	Cajabamba	Cajamarca	Celendín	Chota	Cutervo	Hualgayoc	San Marcos	
E45-M35	0.09	0.10	0.10	0.10	0.06	0.09	0.11	0.11
E32-M59	0.14	0.12	0.17	0.15	0.11	0.17	0.15	0.17
E40-M35	0.09	0.08	0.11	0.09	0.08	0.11	0.10	0.11
E40-M50	0.14	0.13	0.15	0.16	0.09	0.17	0.17	0.17
E35-M59	0.12	0.13	0.12	0.10	0.10	0.13	0.12	0.13
E45-M59	0.10	0.12	0.11	0.11	0.09	0.13	0.12	0.12

Estos valores varían de 0.11 a 0.17. Se observa que la combinación más informativa es el par de iniciadores E40-M50 y E32-M59 con un valor total de PIC de 0.17 y la menos informativa son los pares de iniciadores E45-M35 y E40-M35 con un valor total de PIC de 0.11 lo que quiere decir que presentan una baja capacidad para detectar polimorfismos en la colección en estudio.

4.2.3. Dendograma de caracterización molecular

Las 138 accesiones de oca evaluadas morfológicamente también fueron analizadas molecularmente. Con un total de 194 marcadores polimórficos AFLP y tomando el coeficiente SM se procedió a generar el dendograma de caracterización molecular (Figura 11). La inspección visual de este dendograma a un coeficiente de similitud de 1, reveló que no presenta ningún duplicado de ocas para la colección en estudio, es decir para la colección en estudio no se presentan clones. Asimismo, no se evidencia relación entre lugar de procedencia ni por color de tubérculo, lo que evidencia que los marcadores AFLP no están asociados a dicho carácter.

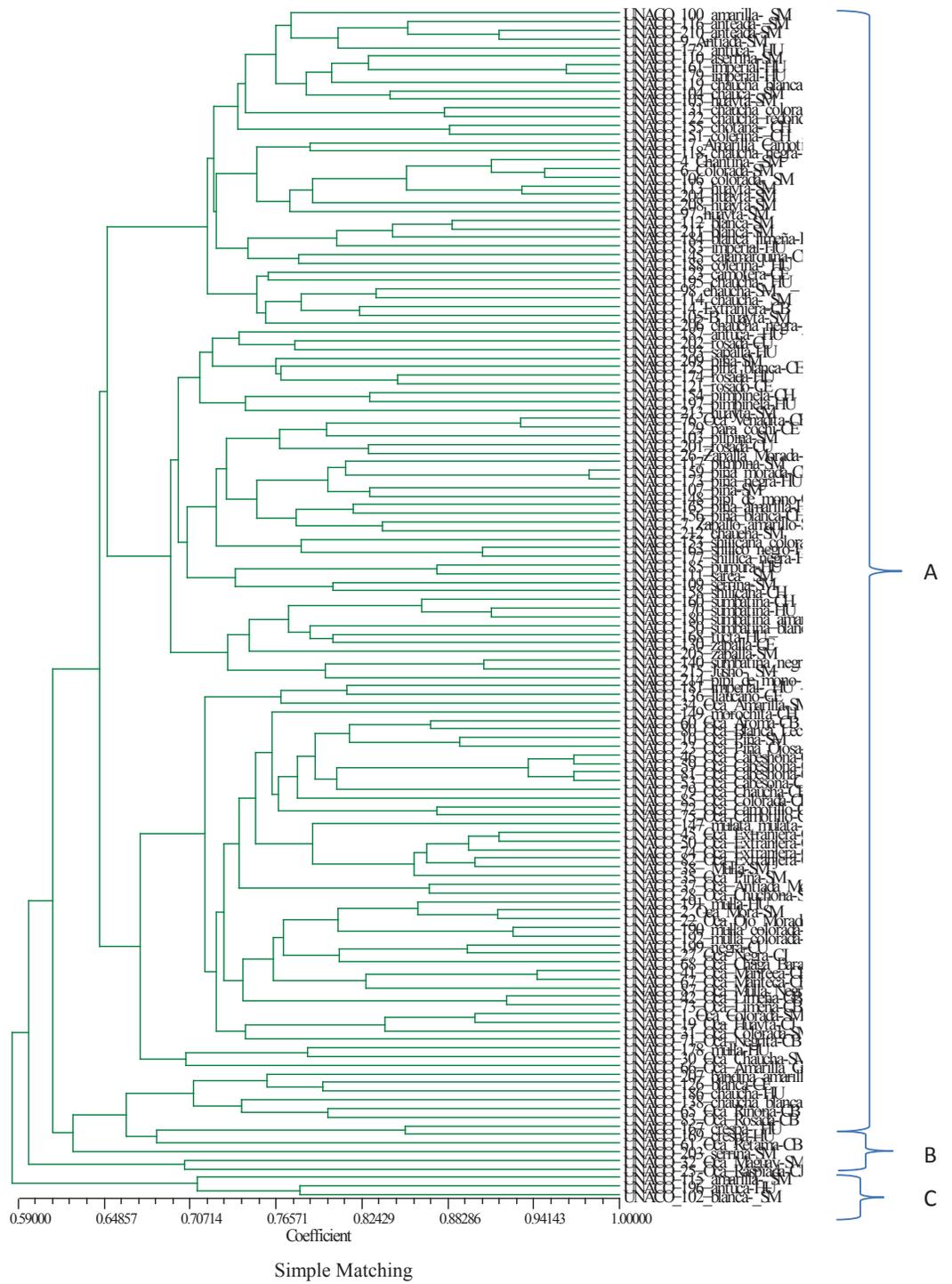


Figura 11: Dendrograma de Caracterización Molecular basado en 194 marcadores AFLP polimórficos de 138 ocas cultivadas de la región Cajamarca

Con un coeficiente de similitud de emparejamiento simple o SM de aproximadamente 0.6 se puede observar 3 grupos bien marcados. El primer grupo (A) incluyen 3 accesiones de las provincias de Hualgayoc y de San Marcos. El segundo grupo (B) sólo incluyen 2 accesiones de San Marcos y Cajamarca y el tercer grupo (C) incluyen accesiones que provienen de las 7 provincias de la región Cajamarca. La formación de estos 3 grupos marcados también ha sido reportado en las investigaciones realizadas por Zorilla, (2006), Biondi (2006) y Adrianzen, (2007). Esto indicaría el aporte de 3 genomas diferentes lo que explicaría el origen alopoliploide de la oca, propuesto por Emshwiller y Doyle (2002).

Si bien no se encontraron duplicados, es decir accesiones que compartan 100 por ciento de los marcadores polimórficos, se encontraron dos accesiones que comparten 98 por ciento de estos, ambos de la variedad “piña” provenientes de las provincias de Chota y Hualgayoc que se encuentran geográficamente cerca. A un coeficiente de similitud de aproximadamente 0.90 se encontró 118 grupos de accesiones de ocas diferentes. Además, se pudo encontrar relación entre 11 grupos de accesiones de oca que se agrupan según el nombre local dado por los agricultores (Cuadro 13).

Cuadro 13. Accesiones de oca con nombres locales iguales a un nivel de similitud de 0.9

Grupo	Accesión	nombre local	procedencia
3	UNACO-210	anteada	San Marcos
	UNACO-009	anteada	San Marcos
6	UNACO-161	imperial	Hualgayoc
	UNACO-179	imperial	Hualgayoc
17	UNACO-006	colorada	San Marcos
	UNACO-106	colorada	San Marcos
18	UNACO-113	huayta	San Marcos
	UNACO-204	huayta	San Marcos
49	UNACO-159	piña	Chota
	UNACO-173	piña	Hualgayoc
64	UNACO-170	sumbatina	Hualgayoc
	UNACO-180	sumbatina	Hualgayoc
78	UNACO-046	cabeshona	Cajabamba
	UNACO-059	cabeshona	Cajabamba
	UNACO-081	cabeshona	Cajabamba
	UNACO-053	cabeshona	Cajabamba

	UNACO-045	extranjera	Cajabamba
84	UNACO-050	extranjera	Cajabamba
	UNACO-190	mulla colorada	Hualgayoc
93	UNACO-192	mulla colorada	Hualgayoc
	UNACO-041	manteca	Hualgayoc
97	UNACO-067	manteca	Hualgayoc
	UNACO-042	limeña	Cajabamba
99	UNACO-073	limeña	Cajabamba

4.2.4. Análisis de Varianza molecular (AMOVA)

La división jerárquica de la diversidad de las ocas cultivadas de la región Cajamarca se investigó mediante el análisis de varianza molecular o AMOVA (Excoffier *et al*, 1992). Este análisis se realizó utilizando el Software estadístico Arlequin 3.5.1.3. Para este estudio se combinó las provincias de Chota con Cutervo y Celendín con Cajamarca como dos grupos ya que se buscó equiparar la cantidad de accesiones por provincia estudiada. Los resultados del AMOVA fueron calculados en base a 1023 permutaciones. En el cuadro 14 se resumen los datos obtenidos.

Cuadro 14: Análisis de Varianza molecular (AMOVA) para 138 accesiones de oca cultivadas de 5 provincias de la región Cajamarca

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
entre provincias	4	241.901	1.09090 Va	3.34 %
entre accesiones dentro de las provincias	133	4199.360	31.57414 Vb	96.66 %
Total	137	4441.261	32.66504	
Valor de Fst	0.03340			

P valor < 0.001

Los resultados obtenidos en el AMOVA indican que una gran parte de la variación genética (96.66%) se origina por la variación encontrada dentro de las provincias de

la región Cajamarca, es decir entre las accesiones de ocas cultivadas estudiadas, lo que permite pensar que no existe una estructura genética poblacional diferenciada entre provincias. Por otro lado sólo el 3.34 por ciento de la variación se explica por la variación encontrada entre las ocas cultivadas en cada una de las provincias.

Además se calculó el valor del índice de fijación o F_{st} que representa el grado de diferenciación genética entre las provincias estudiadas en función de las frecuencias alélicas. Se puede observar que este valor es menor que 0.05 ($F_{st} = 0.03340$), esto sugiere que la diferenciación genética entre las cincoprovincias es pequeña. El valor de P (menor que 0.001) indica que el valor de F_{st} es significativo.

Una posible explicación para este resultado es el manejo tradicional de este cultivo por parte de los agricultores altoandinos (comercialización, trueques, intercambio familiar, mezclas, ferias de biosiversidad) además de la naturaleza octoploide de la oca. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado por Biondi (2006), Schibli (2006), Zorrilla (2006), Adrianzén (2007), Nagatomy (2011). Todos ellos encontraron que el mayor porcentaje de variación encontrada se dio dentro de las accesiones de oca estudiadas entre las poblaciones, provincias o localidades. Lo que sugiere que el manejo de este cultivo por parte de los agricultores es similar en todo el Perú.

4.3.Relación entre la caracterización morfológica y molecular

Según lo encontrado en el presente estudio, los resultados del análisis molecular no son concordantes con los resultados obtenidos en el análisis morfológico. En este se obtuvo siete morfotipos repetidos, mientras que en el análisis molecular evaluando 194 marcadores AFLP no se encontró ningún duplicado, es decir no existen ocas que sean cien por ciento similares. En consecuencia esto implicaría la existencia de mayor variabilidad dentro de las accesiones evaluadas ya que con los marcadores moleculares se analiza la mayor parte del genoma lo que no es posible realizar con los marcadores morfológicos.

Los resultados encontrados concuerdan con lo reportado por Pissard *et al.* (2008), ellos encontraron una elevada diversidad genética intravarietal en muestras de

O.tuberosa utilizando marcadores moleculares del tipo ISSR, lo que quiere decir que al parecer las diferentes variedades de ocas no son clones, como se esperaría por su propagación clonal en la mayor parte de los casos. Asimismo, Emswiller (2004) al realizar estudios etnotaxonómicos en ocas del distrito de Pisac(Cusco) con marcadores AFLP concluye que las accesiones que comparten las mismas características morfológicas (de planta y tubérculo) no se encuentran ubicadas dentro de los mismos grupos moleculares.

Todo esto puede deberse al método con que los agricultores conservan la oca. El uso de tan pocos criterios, tales como color, forma y uso de los tubérculos, para dar nombre a sus variedades puede explicar la confusión que existe entre tubérculos que comparten diferentes fenotipos pero genotipos similares y la gran cantidad de diversidad intravarietal.

Debido a que la oca es un cultivo de propagación mayormente clonal, la recombinación genética es mínima. La razón que explicaría los resultados obtenidos es la alta ploidía de la especie ($x=8$), o a alteraciones genéticas (epistasia, variación somaclonal, deleciones, inserciones, entre otras). Además, la heterostilia presente en la oca cultivada, que da preferencia a la alogamia, es causante de heterocigosidad. Esto, sumado a la selección efectuada por los agricultores, pudo haber influido en la aparición del gran número de colores y formas que encontramos en esta especie. Ya Malice en el 2010 establece que el proceso evolutivo de los tubérculos andinos, como la oca, ha sido guiado en mayor medida por la presión selectiva impuesta por los grupos campesinos, y por el entorno donde se desarrollan.

Otro punto importante a saber de los sistemas tradicionales de cultivo de tubérculos andinos como la oca que influyen en la variabilidad y estructura genética de esta es la existencia de las ferias de intercambio. Estas se realizan entre agricultores de una misma comunidad y entre comunidades. De hecho, los agricultores otorgan y reciben tubérculos en pequeña escala (en centros de diversidad) pero también en una mayor escala (ferias de biodiversidad y mercados), es por esto que al momento de realizar el análisis de variabilidad molecular con marcadores AFLP estos no fueron capaces de discriminar los lugares de procedencia de las accesiones. Lo que quiere decir que la región Cajamarca funciona como una unidad en cuanto a territorio para la conservación de oca cultivada, por lo que se observa mayor variabilidad dentro las

poblaciones de oca que entre poblaciones, esto se confirma con los resultados del análisis de varianza molecular.

La variabilidad molecular encontrada entre las accesiones estudiadas se da mayormente a nivel de secuencias no codificantes que no necesariamente están relacionadas a un carácter fenotípico como en los marcadores morfológicos, además los marcadores moleculares son marcadores neutros, es decir no son afectados por el ambiente, mientras que los marcadores morfológicos podrían estar sometidos a efectos ambientales. Es por esto que se observa mayor diversidad entre las colecciones estudiadas mediante el uso de marcadores AFLP que con los marcadores morfológicos.

V. CONCLUSIONES

- Los análisis morfológicos muestran alta variabilidad tanto en descriptores cualitativos y cuantitativos. Dentro de ellos los descriptores más polimórficos fueron: color predominante del tubérculo, color secundario del tubérculo y forma del tubérculo. Por otro lado, los descriptores cuantitativos también presenta variación amplia en tamaño de planta, número de tallos principales, y tamaño de tubérculos, los que estarían asociados con variabilidad potencial en su performance agronómico.
- Las 6 combinaciones de iniciadores generaron 194 fragmentos polimórficos, y la variabilidad molecular en las 7 provincias de Cajamarca es amplia, con un $F_{st} = 0.03$, no existe fijación de alelos exclusivos por provincias. Además, se identificó cuatro nuevas combinaciones informativas de iniciadores AFLP para el estudio de variabilidad genética de oca (E45/M35, E32/M59, E40/M50, E45/M59).
- Se identificaron 129 morfotipos, evaluados con un coeficiente de disimilitud de cero y un porcentaje de duplicación de 6.5 por ciento. No se encontró ningún duplicado en el análisis molecular al evaluar con un coeficiente de similitud igual a uno. Sin embargo, la evaluación con un coeficiente de 0.9 arrojó 118 grupos de oca.

VI. RECOMENDACIONES

- Para caracterizaciones futuras de ocas de la región Cajamarca se recomienda evaluar especies silvestres y cultivadas con el fin de determinar la relación genética y definir estrategias de mejoramiento.
- Evaluar las accesiones colectadas con marcadores moleculares específicos para la especie *O. tuberosa* como por ejemplo marcadores SSR, SNP o el secuenciamiento específico.
- Realizar evaluaciones agronómicas para ver la potencialidad de algunos genotipos y su uso en programas de mejoramiento genético.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrianzen, P. 2007. Análisis de la Diversidad Genética de Ocas Cultivadas (*Oxalis tuberosa* Molina.) de Cuatro Comunidades Campesinas del Cuzco Usando Marcadores Moleculares AFLP. Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima-Perú. 97p.

Arbizu, C.; Tapia, M. 1992. Tubérculos andinos. PP. 147-161 En: Cultivos marginados: Otra perspectiva de 1492. FAO; Jardín Botánico de Córdoba.

Arbizu, C.; Blas, R.; Holle, M; Vivanco, F.; Ghislain, M. 1997. Advances in the morphological characterization of oca, ullucu, mashua and arracacha collections. International Potato Center. Program Report 1995-1996. Lima, Perú.

Arbo, M.; Ferrucci, M.; Gonzales, A.; Cáceres, A.; Peichoto, M.; Popoff, O.; Salgado, C. (2001 – 2008). Botánica Morfológica, [en línea]. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/>

Bassam, B; Caetano-Anolles, G; Gresshoff, G. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem, 196: 80-83.

Becerra, M. 1995. Evaluación agronómica y contaje cromosómico del germoplasma de Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) de la Universidad Nacional de Cajamarca. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. Cajamarca- Perú. 130 pp.

Biondi, J. 2006. Análisis de la Diversidad Genética de la colección de *Oxalis tuberosa* Molina. “oca” mantenida en el Centro Internacional de la Papa, usando marcadores AFLP. Lima Perú. Tesis para optar el título de Biólogo en la Universidad Ricardo Palma. Lima Perú. Pp.80.

Bonnave, M; Bleeckx, G; Rojas Beltrán, J; Maughan, P; Flamand, M-C; Terrazas, F; Bertin, P. 2013. Farmers' unconscious incorporation of sexually-produced genotypes into the germplasm of a vegetatively-propagated crop (*Oxalis tuberosa* Molina.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 61(4): 721–740.

Cárdenas, M. 1969. Manual de plantas económicas de Bolivia. Imprenta Ictchus. Cochabamba, Bolivia. 421 p.

Cárdenas, M. y Hawkes, J.G. 1948. Número de cromosomas en algunas plantas nativas cultivadas por los indios de Los Alpes. *Revista de Agricultura de la Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia* 5(4): 30-32.

Cárdenas, M. 1989. Manual de Plantas económicas de Bolivia. Segunda Edición: Editorial Los Amigos del Libro. La Paz, Bolivia. 333pp.

Carrión, S.; Hermann, M y Trognitz, B. 1995. Biología Reproductiva de la Oca (*Oxalis tuberosa* Molina.) *Boletín de Lima*; N° 98, pp. 48-68.

Chase, M.; Reveal, J. 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, pp 122-127.

De Azkue, D.; Martinez, A. 1990. Chromosome number of the *Oxalis tuberosa* Alliance (Oxalidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 169, pp 25-29.

Donayre, A.J. 2000. Estudio de la diversidad Genética de *Oxalis tuberosa* Molina. “oca” de la comunidad de Picol, distrito de Taray, Provincia de Calca, Cusco, mediante la técnica RAPD' s. Tesis para optar el título profesional de Biólogo, Universidad Mayor de San Marcos, Lima Perú.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.

Emshwiller, E. 2001. Información para la conservación de diversidad en *Oxalis tuberosa*, un proyecto piloto con AFLP. Resúmenes del X. Congreso Internacional de Cultivos Andinos: Universidad Nacional de Jujuy (Argentina); Ministerio de la Producción; FUNDADES. P. 18.

Emshwiller, E. 2002. Ploidy levels among species in the “*Oxalis tuberosa* alliance” as inferred by flow cytometry. *Annals of Botany (UK)* 89: 741-753.

Emshwiller, E. 2004. Patrones de diversidad genotípica en el cultivo de oca (*Oxalis tuberosa* Molina). Datos de marcadores AFLP comparados con la etno taxonomía. Resúmenes del XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos. Fundación PROINPA; Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios (MACA).

Emshwiller, E. y Doyle, J. 1997. De donde viene la oca? Datos preliminares de secuencias de AND. Resúmenes de San Antonio Abad del Cusco. (UNSAAC), Centro de Investigación en Cultivos Andinos (CICA).; Asociación Arariwa. Cusco (Perú) p.28.

Emshwiller, E. y Doyle, J. 2002. Origins of Domestication and Polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae) 2: Chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpGS) data. *American Journal of Botany* 89(7): 1042-1056.

Emshwiller, E.; Theim, T.; Grau, A.; Nina, V & Terrazas, F. 2009. Origins of Domestication and Polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*; Oxalidaceae). 3. AFLP data of Oca And Four Wild, Tuber-Bearing Taxa. *American Journal of Botany* 96(10): 1839-1848.

Excoffier, L., Smouse, P. and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479- 491.

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco. Res.* 10: 564-567.

Fernandez, A. & Rodríguez, E. 2007. *Etnobotánica del Perú Pre-Hispano*. Ediciones Herbarium Truxillense (HUT), Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

Gibbs, P.E.; Marshall, D.; Brunton, D. 1978. Studies on the cytology of *Oxalis tuberosa* and *Tropaeolum tuberosum*. Notes from The Royal Botanic Garden Edinburgh 37(1): 215-220.

Gonzales, G. 2008. Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y microsatélites en Rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Tesis para optar el grado de doctor en ciencias Biológica. Universidad de Santiago de Compostela. España. 244 p.

Hayano, A. 1998. Citogenética de *Oxalis tuberosa* Molina. “Oca”: Número Cromosómico y Analisis Cariotipico. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Ricardo Palma. Lima-Peru.

Hildebrand C.E., Torney D.C., and Wagner R.P. 1992. Informativeness of Polymorphic DNA Markers. Los Alamos Science 20, 100-102.

INEI. 2013. Cajamarca: Compendio estadístico 2013. Oficina Departamental de Estadística e Informática. www.inei.gob.pe.

IPGRI-CIP 2001. Descriptores de Oca (*Oxalis tuberosa* Molina.) Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Rome; Centro Internacional de la Papa, Lima.

King, S.R.; Gershoff, S.N. 1987. Nutritional evaluation of three underexploited Andean tubers: *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae), *Ullucus tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaealaceae). Economic Botany (USA). 41(4): 503-511.

Kostoff, D.; Dogadkina, N.; Tichonova, A. 1935. Chromosome number of certain angiosperm plants (*Nicotiana*, *Petunia*, *Oxalis*, *Secale* and *Punica*). Comptes Rendus (Doklady) de l'Academie des Sciences de l'URSS 3(9): 401-404.

Malice, M. 2009. Genetic Diversity and Structure of Three Andean Tubers: *Oxalis tuberosa* Molina, *Ullucus tuberosus* Caldas and *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences

agronomiques et ingénierie biologique. Universitaire Des Sciences Agronomiques de Gembloux. 197 p.

Marks, G.E. 1956. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. *New Phytologist* 55(1): 120-129.

Medina, H.T. 1994. Contaje cromosómico de la Oca (*Oxalis tu berosa* Molina.) conservada in vitro. Tesis para optar el título de Ing. Agr. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo-Perú. 47 pp.

MINAGRI, 2013. Series históricas de Producción Agrícola – compendio estadístico. Disponible en: <http://frenteweb.minagri.gob.pe/sisca/>

MINCETUR, 2014. Región Cajamarca. Diagnóstico para el diseño del plan estratégico nacional de exportación. Disponible en: http://www.mincetur.gob.pe/comercio/OTROS/Perx/perx_cajamarca/pdfs/Diagnostic_o.pdf

Moscoe, LJ; Emshwiller, E. 2014. Diversity of *Oxalis tuberosa* Molina: a comparison between AFLP and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* Aug. 2014.

Mostacero, Castillo, Mejía, Gamarra, Charcape & Ramírez. 2011. Plantas Medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. ANR (Asamblea Nacional de Rectores), Lima, Perú.

Nagatomy, A. 2011. Análisis Molecular de la Diversidad genética de Accesiones peruanas de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” de Kitchki-Huánuco. Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima-Perú.

Nagy S, Poczai P, Cernák I, Gorji AM, Hegedűs G and Taller J (2012) PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics* Volume 50, Issues 9-10, pp 670-672.

National Research Council. 1989. The lost crops of the incas: Little known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press. Washington D.C.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:3321-3323

Orbegoso A. 1957. Estudio sobre la estructura y variabilidad de la oca (*Oxalis tuberosa* Molina.). Instituto Interoamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica.

Oyanedel, N. 2010. Análisis de la variabilidad genética de ejemplares de la especie vegetal *Broussonetia papyrifera* en la Polinesia: Evaluación mediante AFLP de un nuevo trazador de rutas migratorias humanas. Tesis para optar el grado de Magister en Bioquímica, área de especialización en toxicología y diagnóstico molecular y memoria para optar el título profesional de Bioquímico. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 80 p.

Pissard, A.; Ghislain, M.; Bertin, P. 2006. Genetic diversity of the Andean tuber-bearing species, oca (*Oxalis tuberosa* Molina.), investigated by inter-simple sequence repeats. Genome 49: 8-16

Pissard, A.; Arbizu, C.; Ghislain, M.; Faux, A.; Paulet, S.; Bertin, P. 2008. Congruence between morphological and molecular markers inferred from the analysis of the intra-morphotype genetic diversity and the spatial structure of *Oxalis tuberosa* Molina. Genética 132:71-85.

Programa Colaborativo Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos, 1996.

Quinchuqui, M. 2009. Implementación de un banco de germoplasma activo de cultivos andinos nativos marginales como: Melloco (*Ullucus tuberosus*), Oca (*Oxalis tuberosa*), Mashwa (*Tropaelum tuberosum*), Jícama (*Smallanthus sonchifolius*), en el cantón Antonio ante. Informe final del proyecto de investigación previa a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ibarra-Ecuador. 112 p.

Ramirez, M. 2002. On farm conservation of minor tubers in Peru: The dynamics of oca "*Oxalis tuberosa*" landrace management in a peasant community. Plant Genetic Resources Newsletter (Italy) 132: 1-9

Rohlf, F. 2001. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versión 2.01. Exeter Software, Setauket, New York.

Schibli, R. 2007. Análisis de la Diversidad Genética de *Oxalis tuberosa* Molina. "Oca" de 2 comunidades del Cusco usando marcadores AFLP. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Peru. 126 pp.

Sevilla, R. & Holle, M. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Ed. Torre Azul. Lima, Perú.

Sokal, R; Michener, C. 1958. A statical method for evaluating systematic relationships. University Kansas Scientific Bulletin 38: 1409-1438.

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]." will do. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Talledo, D. y Escobar, C, 1995. Citogenetica de *Oxalis tuberosa*: Ciclo celular y número cromosómico. BIOTEMPO (Perú) 2: 33-46

***The Plant List* (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (Vista el 17 de Julio, 2014)**

Toledo, J.; Quiros, C.; Ghislain, M.; Golmirzaie, A. 1995. Uso de RAPD en evaluación de germoplasma de *Oxalis tuberosa*. III Congreso Peruano de Genética. Lima (Perú). Sociedad Peruana de Genética. Congreso Peruano de Genética: Resúmenes. Pp 165-166.

Ugarte, M. y Baudoin, J. 2004. Conservación ex situ de tubérculos andinos y analisis de datos de la diversidad genética de la oca (*Oxalis tuberosa* Molina.). XI Congreso Internacional de Cultivos andinos: Fundación PROINPA. Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios (MACA). Cochabamba (Bolivia). Libro de resúmenes. N°. A-16.

Ugent, D. & Ochoa, C. 2006. La Etnobotánica del Perú. Desde la Prehistoria al Presente. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), Lima, Perú. Cuarta edición.

Valladolid, A. 1996. Niveles de ploidia de la oca (*Oxalis tuberosa* Molina.) y sus parientes silvestres. Tesis para optar el título de Magister Scientiae, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van De Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Reserch 23:4407-4414.

Zorrilla, C. 2006. Diversidad Genética de cultivares nativos de papas amargas y ocas. Tesis para optar el grado de licenciado en Biología, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1 - Descriptores morfológicos en Oca según IPGRI (2001)

Descriptores Cualitativos

Nº	Descriptor Cualitativo	Estado del descriptor
1	Color de tallos aéreos	1= verde amarillento; 2= verde grisáceo predominante con rojo grisáceo 3 = rojo grisáceo 4= purpura rojizo 5= purpura grisáceo
2	Pigmentación de axilas	0 = ausente; 1= presente
3	Color del follaje	1 = verde amarillento; 2 = verde amarillento oscuro; 3 = verde amarillento oscuro con purpura grisáceo; 4 = purpura grisáceo con verde amarillento oscuro.
4	Color del envés de los foliolos	1 = verde amarillento; 2 = verde amarillento con nervadura rojo grisáceo; 3 = verde amarillento con purpura grisáceo irregularmente distribuido; 4 = purpura rojizo con verde amarillento irregularmente distribuido 99 = otro
5	Color del peciolo	1 = verde con estípulas blancas; 2= verde con estípulas purpura grisáceo claro; 3 = verde con estípulas purpura grisáceo; 4 = púrpura grisáceo con estípulas púrpura grisáceo oscuro; 5 = Rojo grisáceo con estípulas purpura grisáceo oscuro.
6	Habito de floración	0 = ninguna; 1 = escasa; 2 = moderada; 3 = abundante
7	Tipo de planta	1 = erecto 2 = procumbente
8	Forma de planta	1 = Cilíndrica 2 = Laxo 3 = esférico
9	Distribución en el tallo	0=Ausente 1=A lo largo de todo el tallo 2=En las puntas 3=Tallos secundarios 4=En puntas y tallos secundarios
10	Pigmentación de las axilas	0 = ausente 1 = bajo (pigmentación tenue) 2 = medio 3= tardío
11	Envés jaspeado	0 = ausente 1 = presente

12	Virus	0 = ausente 1 = presente
13	Floración	1 = Precoz 2 = tardío
14	Color predominante de la superficie de los tubérculos	1= blanco; 2= blanco amarillento; 3= amarillo; 4= naranja amarillento; 5 = rojo naranja; 6 = rojo naranja oscuro; 7 = rojo claro (rosado); 8 = rojo pálido; 9= rojo; 10 = púrpura rojizo; 11 = púrpura grisáceo claro; 12 = púrpura grisáceo oscuro 13 = púrpura grisáceo
15	Color secundario de la superficie de los tubérculos	0 = ausente; 1 = blanco; 2 = blanco amarillento; 3 = amarillo; 4 = naranja amarillento; 5 = rojo naranja; 6 = rojo claro (rosado); 7 = rojo pálido; 8= rojo; 9 = rojo grisáceo; 10 = púrpura rojizo; 11 = púrpura grisáceo 12= púrpura grisáceo oscuro
16	Distribución del color secundario de la superficie de los tubérculos	0 = ausente; 1 = ojos; 2 = alrededor de ojos; 3 = sobre tuberizaciones; 4 = ojos e irregularmente distribuido; 5 = Irregularmente distribuido; 6 = Veteaduras sobre tuberizaciones principales
17	Color predominante de la pulpa de los tubérculos	1 = blanco; 2 = blanco amarillento; 3 = amarillo; 4 = naranja amarillento; 5 = rojo naranja; 6 = rojo; 7 = rojo grisáceo; 8 = púrpura rojizo; 9 = púrpura grisáceo
18	Color secundario de la pulpa de los tubérculos	0 = ausente; 1 = blanco; 2 = blanco amarillento; 3 = amarillo; 4 = naranja amarillento; 5 = rojo naranja; 6 = rojo claro (rosado); 7 = rojo pálido; 8= rojo; 9 = rojo grisáceo; 10 = púrpura rojizo; 11 = púrpura grisáceo
19	Distribución del color secundario de la pulpa de	0 = ausente; 1 = corteza;

	los tubérculos	2 = anillo vascular; 3 = Médula; 4 = Anillo vascular y corteza; 5 = Médula y corteza
20	Forma de los tubérculos	1 = ovoide; 2 = claviforme; 3 = alargado; 4 = cilíndrico
21	Intensidad de fasciación	0= ausencia 1 = presencia
22	Forma de yemas	1 = horizontales 2 = curvos
23	Profundidad de yemas	1 = superficiales 2 = profundas
24	Ancho de brácteas	1 = estrechas 2 = amplias
25	Largo de brácteas	1 = casi inexistentes 2= cortas 3= amplias
26	Presencia de quimeras	0 = ausencia 1 = presencia
27	Superficie de piel	1 = liso 2 = rugoso

Descriptorios cuantitativos

Nº	Estado de planta	Descriptor Cuantitativo
1	Vegetativo	Altura de la planta
2		Largo de foliolos
3		Ancho de foliolos
4		Largo de peciolo
5		Diámetro del tallo
6		Número de tallos
7	Tubérculo	Ancho del tubérculo
8		Largo del tubérculo

ANEXO 2 - Materiales y Equipos de Laboratorio utilizados

Materiales

- Bandejas y tapas de plástico
- Cajas de dilución de 96 pocillos, 1 mL de capacidad c/u
- Cintas para rótulos
- Espátulas, pinzas, tijeras
- Gradillas y soportes para tubos
- Guantes de latex
- Juego completo de pipetores
- Matraces Erlenmeyer (Pyrex)
- Morteros y pilón de porcelana
- Papel tissue
- Papel toalla
- Placas de vidrio para electroforesis vertical
- Probeta de 10, 100, 1000 mL
- Puntas plásticas de 10, 200 y 1000µl de capacidad
- Termómetro
- Tubos para microcentrifuga de 0.6, 1.7 y 2 mL (Eppendorf)
- Vasos de precipitación

a. **Reactivos químicos.**

- Aceite mineral
- Ácido acético glacial
- Acrilamida
- Agarosa
- Agua destilada
- Agua libre de nucleasas
- Alcohol isoamílico (Merck)
- Azul de bromofenol
- Bind Silano adherente, Silane A 174
- Bromuro de Etidio

- Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) (Sigma)
- β – mercaptoetanol (Sigma)
- Carbonato de sodio
- Cloroformo
- Cloruro de magnesio solución 1 M
- Cloruro de sodio
- Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP,dTTP)
- EDTA (ácido etilen diamino tetra-acético)
- Etanol absoluto 70% y 95%
- Formaldehído al 37%
- Formamida
- Glicerol
- Hidróxido de sodio
- Isopropanol
- Marcador de peso molecular (Gene Ruler TM 100bp DNA Ladder, Fermentas Life Sciences)
- Marcador de peso molecular, DNA del fago Lambda, Pst I
- Nitrato de plata
- Nitrógeno líquido
- Persulfato de amonio
- PVP
- Revelador y fijador de fotografía
- RNA asa A
- SDS
- SigmaCote
- TEMED (N,N, N' N' – Tetra – metil etilen diamina)
- Tiosulfato de sodio
- Tris (Tris [hidroxymethyl] amino ethan), (Merck)
- Úrea
- Xilén cianol

b. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica

- Bomba de vacío
- Cámara de baño María
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de electroforesis vertical
- Cámara digital Cybershot 10.0 Mpix
- Congelador a -10°C y a -20°C
- Escáner
- Estufa
- Expositor de luz UV transiluminador 2000
- Fuente de poder
- Horno microondas
- Impresora láser
- Micro centrífuga
- Micropipeta 1-10 uL
- Micropipeta 10-200 uL
- Micropipeta 101-1000 uL
- Purificador de agua
- Refrigeradora
- Shaker para bandejas
- Termociclador
- Vortex

ANEXO 3 - Protocolo de extracción de ADN: Método de CTAB con algunas modificaciones

- 1.** Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de preferencia de hojas jóvenes aproximadamente 200 mg.
- 2.** En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 µl y resuspender con 700 µl de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 µl de β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
- 3.** Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.
- 4.** Agregar 700 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclar suavemente el tubo y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 5.** Adicionar 50 µl de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido.
- 6.** Adicionar 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 7.** Agregar $\frac{3}{4}$ partes del volumen final (500 µl aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 °C durante 40 min.
- 8.** Centrifugar 20 min a 12 000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
- 9.** Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 70% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
- 10.** Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 95% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
- 11.** Permitir que el ADN(pellet) se seque al aire libre por 2 horas invirtiendo el tubo y luego resuspender el ADN en 80 µl de buffer T10E1 o agua estéril (aproximadamente) y almacenar a -20 °C.

ANEXO 4 - Análisis de Calidad y Cuantificación de ADN

Corrida electroforética

Se tomó 1 μ l de muestra extraída y se mezcló con 9 μ l de Tampón de carga SALB 1X

Reactivos y Soluciones

Tampón de carga de agarosa (10X)

SALB 10x	50ml
Azul de Bromofenol	75mg
Xilencianol	75mg
Orange G	100mg
TBE 10x	2.5ml
Sucrosa	30gr

Empezar con 10ml de H₂O milli Q luego se enraza a 50ml y se autoclava.

Buffer de corrida TBE 10x (1litro)

TBE 10x	
Tris base	108gr
Ácido bórico	55gr
EDTA 0.5 molar Ph 8:00	40ml
Enrazar y autoclavar.	

Agarosa

Componentes	Molde de 30ml	Molde de 60ml	Molde de 250ml
TBE 1X	30ml	60ml	250ml
Agarosa	0.3 g	0.6 g	2.5 g
Bromuro de Etidio	0.3 μ l	0.6 μ l	2.5 μ l

Correr con Buffer 1X (cámara horizontal) en volúmenes apropiados

Procedimiento

La calidad y concentración del ADN genómico fueron determinadas por análisis comparativos de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa, donde este último forma un complejo con el ADN que al ser expuesto a la luz ultravioleta emite fluorescencia. Para ello se tomó 1 μ l de muestra extraída con 9 μ l de Tampón de carga SALB 1X; y se cargó en un gel de agarosa al 1%, paralelamente a las muestras se carga 10 μ l del marcador de referencia de peso molecular conocido(ADN fago lambda(λ) cortado con la enzima Pst1) con el fin de estimar la concentración de las muestras, comparando la intensidad de cada una de las bandas en el gel usando como referencia la concentración de 280 ng/ μ l para la banda de mayor peso molecular(14,000pb) del ADN fago lambda. La corrida electroforética se realiza a 90 voltios por 60 minutos utilizando como Tampón de corrida TBE 1X, luego se capturo la imagen mediante una caja que emite luz ultravioleta capturándola con una cámara digital y un filtro de color marrón para el lente. Para la posterior cuantificación.

ANEXO 5 - Preparación de geles de poliacrilamida

1. Preparación de la placa pequeña de vidrio (Zona donde se adhiere el gel)
 - a. Limpiar muy bien la placa de vidrio con alcohol. Dejar secar.
 - b. En un tubo de microcentrífuga, prepara la solución de adhesión mezclando 15 μ l de Bind Silane y 15 μ l ácido acético glacial concentrado en 1.5 ml de alcohol al 95%. Dejar una leve agitación a la mezcla.
 - c. Esparcir la solución de adhesión sobre toda la placa de vidrio con la ayuda de un papel tissue o papel Kim Wipes.
 - d. Dejar secar a temperatura ambiente por 30 min.
 - e. Después de transcurrido el tiempo remover las partículas de polvo usando el mismo tipo de papel. Esta limpieza debe ser hecha en una dirección perpendicular, aplicando una ligera presión. Mucha presión podría remover el Bind Silane y el gel podría no adherirse.

2. Preparación de placa grande de vidrio (Zona donde no se adhiere el gel)
 - a. Limpiar muy bien la placa de vidrio con alcohol. Dejar secar.
 - b. Usando un papel tissue o papel KimWipes humedecido con Repel Silane (Sigma), solución que evita que el gel se adhiera al vidrio, esparcir completamente sobre toda la placa.
 - c. Dejar secar a temperatura ambiente por 5 min.
 - d. Momentos antes de iniciar el ensamblaje de los vidrios, remover las particular de polvo usando el mismo tipo de papel. Esta limpieza debe ser hecha en una dirección perpendicular, aplicando una ligera presión. Mucha presión podría remover el Bind Silane y el gel podría no adherirse.

3. Ensamblaje y preparación del gel (poliacrilamida 6%; 7M urea)

Para el ensamblaje del sistema se siguen estos pasos:

 - a. Colocar los espaciadores laterales sobre la placa grande de vidrio (lado tratado).

Sobre ella colocar la placa pequeña de vidrio de manera que los lados tratados estén frente a frente.

- b. Entre las dos placas de vidrios se coloca el espaciador inferior.
- c. Asegurar las esquinas y los puntos medios del sistema con abrazaderas metálicas que ejerzan igual presión en ambos lados
- d. Probar los peines adecuados (de grosor preciso) en la parte superior del sistema.
- e. Tomar un volumen de 60ml de solución de poliacrilamida, adicionar 40 μ l de TEMED y 450 μ l de Persulfato de amonio al 10%, agitar suavemente, verter la solución a la placa de gel ensamblada, por una esquina, de manera continua para evitar la formación de burbujas.

4. Pre corrida y cargado del gel de poliacrilamida

Al cabo del tiempo esperado retirar los peines lavar los residuos de acrilamida en el gel formado llevar a la cámara electroforética; con ayuda de una jeringa hipodérmica retirar las burbujas de la parte superior e inferior del gel y precorrer a un voltaje 1600 voltios por espacio de 20 minutos.

En este tiempo se aprovecha para adicionar los 5 μ l de DYE a las muestras y llevarlas a denaturar por 5 minutos.

Una vez precorrido el gel colocar los peines y cargar las muestras ya denaturadas.

**ANEXO 6 - Reactivos para tinción de geles de poliacrilamida por el método de
Nitrato de plata**

FIJACION DEL GEL

Ácido acético 5ml

Alcohol puro 100ml

H2O destilada 900ml

Agitar por espacio de 20 minutos.

TINCIÓN DEL GEL

Nitrato de plata 2gr

H2O destilada 1000ml

REVELADO DEL GEL

Hidróxido de sodio 30gr

H2O destilada 800ml

Agregar solo antes de usar

Formaldehido 5 a 6ml

FIJACIÓN DEL GEL (STOP)

Parar la reacción con la solución de fijación.

Luego enjuagar con agua destilada y dejar secar

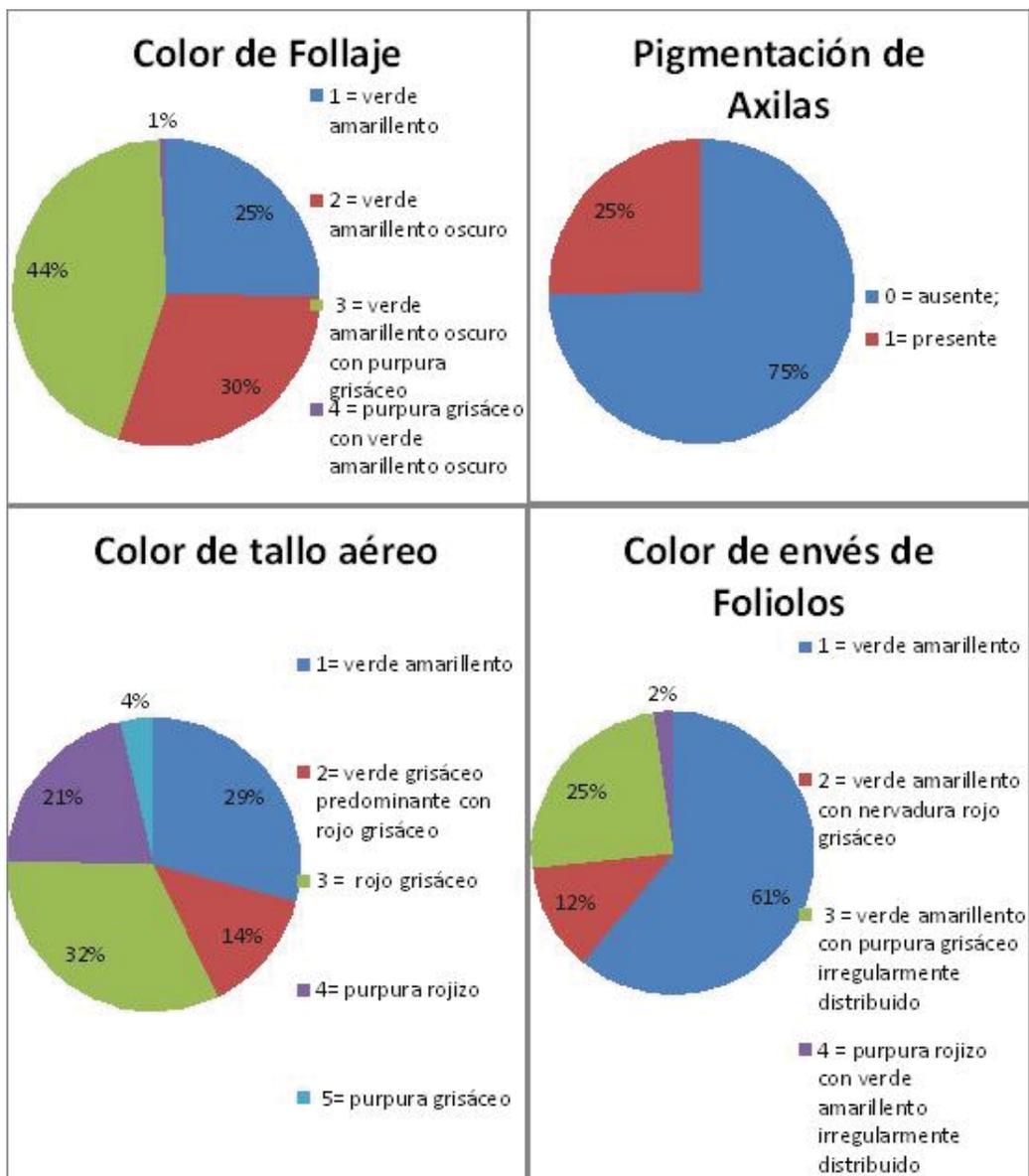
El gel hasta su escaneo o análisis

ANEXO 7 - Descriptores cuantitativos de 138 accesiones de oca cultivada

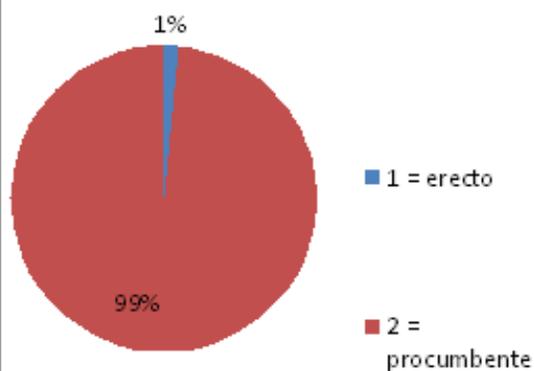
Provincia	altura de la planta	largo de folíolos	ancho de folíolo	largo de peciolo	diámetro de tallo	numero de tallos	ancho del tubérculo	largo del tubérculo
Cajabamba								
Promedio	25.5	2.0	2.6	6.0	8.1	4.3	2.3	7.2
Máximo	40	2.7	3.2	7.8	12	8	3.2	14.5
Mínimo	14	1.3	1.8	4.2	6	2	1.8	3.7
Rango	26	1.4	1.4	3.6	6	6	1.4	10.8
desviación estándar	6.5	0.3	0.3	1.1	1.6	1.2	0.4	2.0
coeficiente de variación	25.4	17.3	13.2	18.6	19.2	27.7	16.0	27.5
Cajamarca								
Promedio	22.7	1.8	2.3	5.7	7.3	4.3	2.3	2.3
Máximo	31	2	2.7	7.4	9	5	2.7	10.7
Mínimo	17	1.4	1.9	3.8	6	3	2	5
Rango	14	0.6	0.8	3.6	3	2	0.7	5.7
desviación estándar	5.9	0.2	0.3	1.3	1.4	0.8	0.2	2.1
coeficiente de variación	26.1	13.4	13.7	22.6	18.6	18.8	10.0	89.5
Celendín								
Promedio	24.4	2.1	2.7	6.5	8.3	4.6	2.4	5.8
Máximo	40	2.5	3.5	9.4	11	8	3.1	9.7
Mínimo	13	1.8	2.4	4.9	5	2	1.8	3.6
Rango	27	0.7	1.1	4.5	6	6	1.3	6.1
desviación estándar	6.0	0.2	0.4	1.2	1.5	1.7	0.4	1.8
coeficiente de variación	24.8	9.9	13.5	19.1	18.6	37.1	18.5	30.3
Chota								
Promedio	23.1	2.1	2.7	6.5	6.8	4.5	2.5	5.8
Máximo	42	2.6	3.3	8.4	9	7	2.8	8.3
Mínimo	15	1.7	2.1	5.1	5	3	1.8	4.1
Rango	27	0.9	1.2	3.3	4	4	1	4.2
desviación estándar	7.5	0.3	0.3	1.0	1.3	1.2	0.3	0.9
coeficiente de variación	32.3	13.0	12.9	15.7	18.7	26.4	11.7	16.0
Cutervo								
Promedio	27.3	2.0	2.6	6.3	9.0	4.7	2.6	7.5
Máximo	31	2.2	3.2	7.8	10	6	3	8.6
Mínimo	24	1.8	2.3	4.5	8	4	2.2	5.5
Rango	7	0.4	0.9	3.3	2	2	0.8	3.1
desviación estándar	3.5	0.2	0.5	1.7	1.0	1.2	0.4	1.8
coeficiente de variación	12.8	10.2	18.7	26.5	11.1	24.7	15.4	23.4
Hualgayoc								
Promedio	24.8	2.1	2.7	6.5	8.2	4.8	2.5	6.3
Máximo	37	3.1	3.9	9.4	11	9	3.3	14.9
Mínimo	13	1.2	2.2	3.6	5	2	1.9	3.4
Rango	24	1.9	1.7	5.8	6	7	1.4	11.5
desviación estándar	5.8	0.4	0.4	1.4	1.8	1.7	0.4	2.2
coeficiente de variación	23.2	17.2	13.8	21.6	21.8	35.6	15.3	34.1
San Marcos								
Promedio	27.5	2.0	2.6	5.7	7.8	5.0	2.4	6.9
Máximo	42	2.5	3.6	8	12	9	3.7	12.2
Mínimo	16	1.4	1.9	4.2	1	2	1.3	3.6
Rango	26	1.1	1.7	3.8	11	7	2.4	8.6
desviación estándar	6.1	0.2	0.4	1.0	2.4	1.5	0.5	1.8
coeficiente de variación	22.2	12.0	14.9	18.1	30.6	30.0	20.5	26.3
Región de Cajamarca								
Promedio	25.6	2.0	2.6	6.1	7.9	4.7	2.4	6.6
Máximo	42	3.1	3.9	9.4	12	9	3.7	14.9
Mínimo	13	1.2	1.8	3.6	1	2	1.3	3.4
Rango	29	1.9	2.1	5.8	11	7	2.4	11.5
desviación estándar	6.3	0.3	0.4	1.2	1.9	1.5	0.4	1.9
coeficiente de variación	24.5	14.4	14.1	19.8	24.3	30.9	17.3	28.6

ANEXO 8 - Gráfico circular de marcadores morfológicos cualitativos

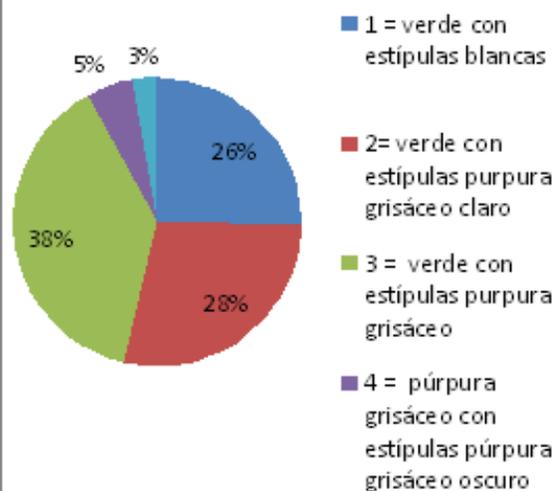
Descriptores morfológicos vegetativos



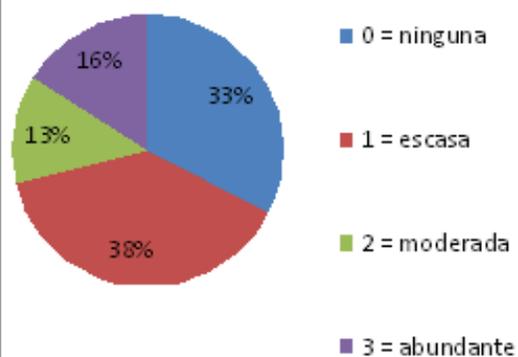
Tipo de planta



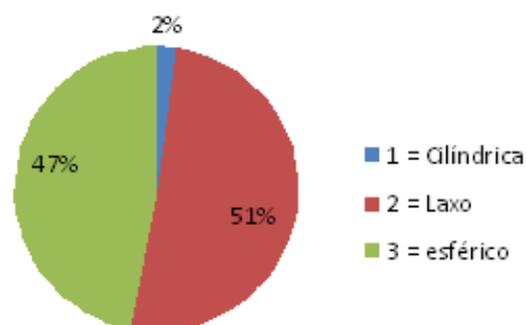
Color de Pecíolo



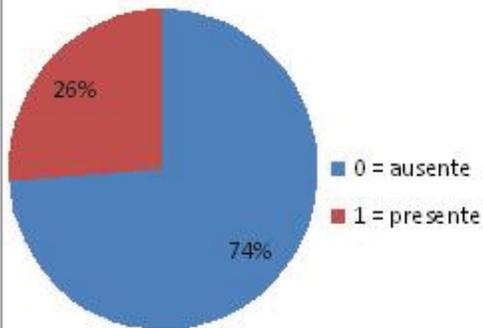
Hábito de floración



Forma de Planta



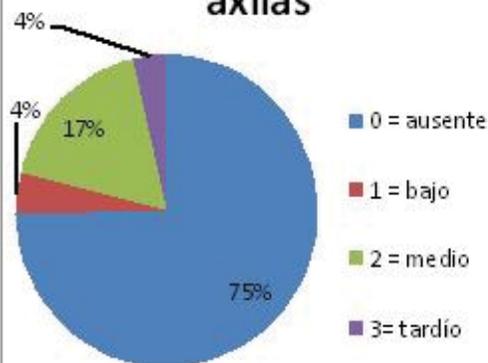
Envés jaspeado



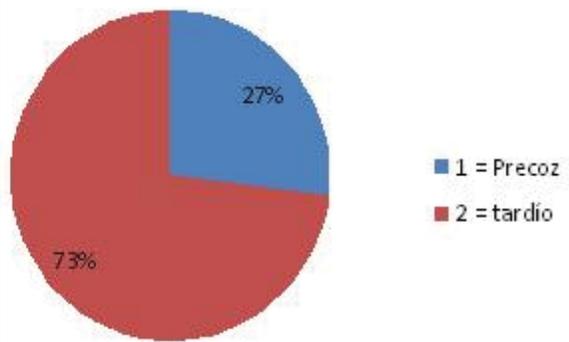
Distribución en el tallo



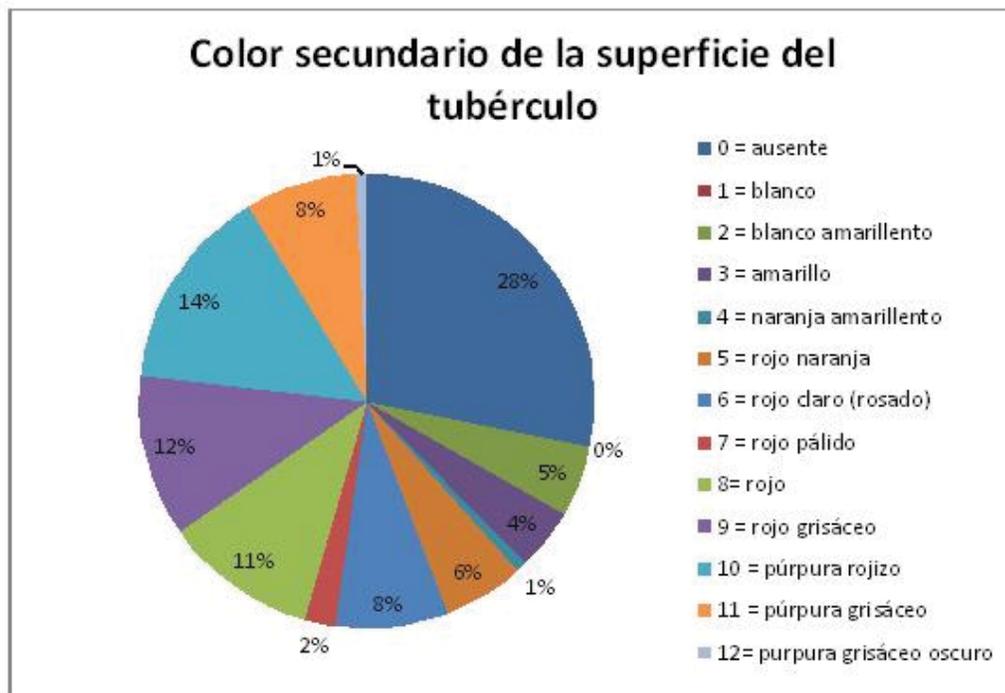
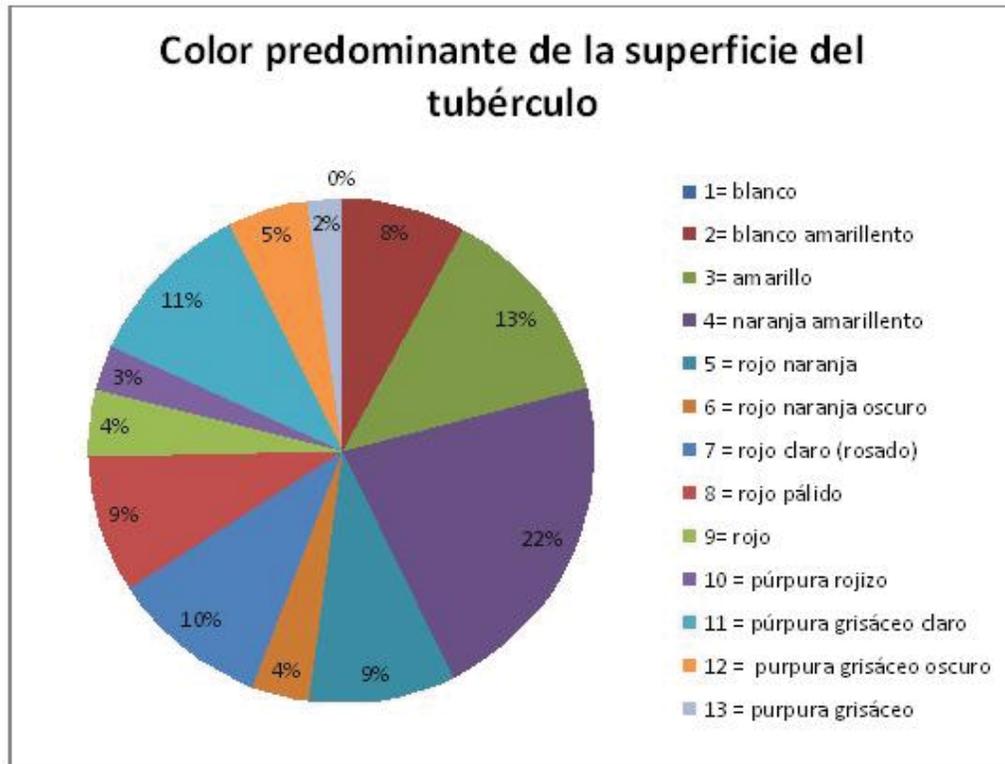
Pigmentación de las axilas



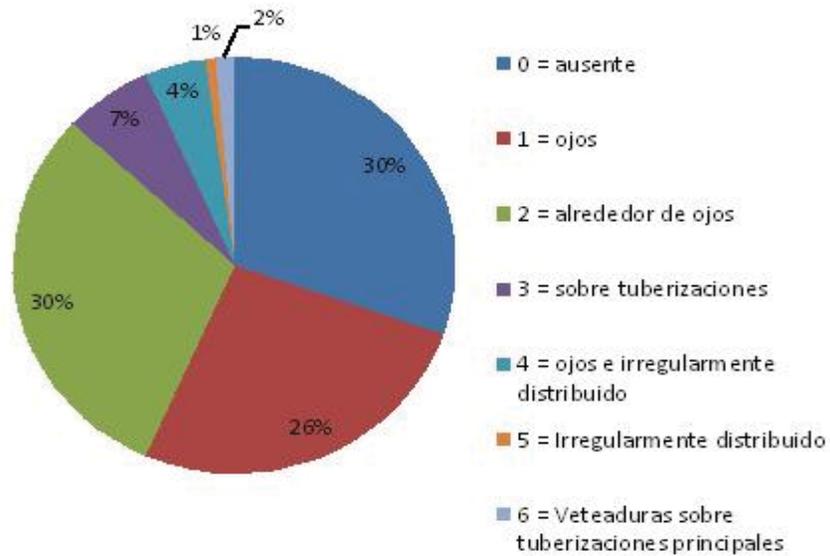
Floración



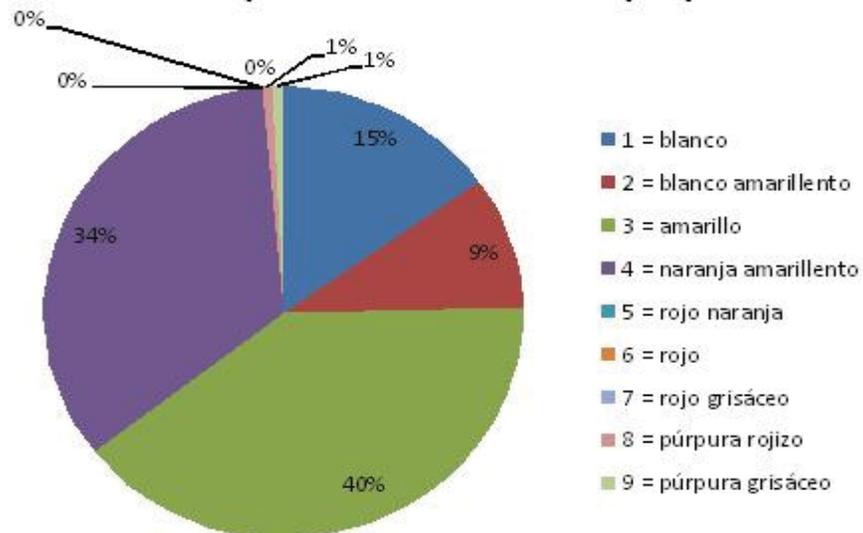
Descriptores Morfológicos: Tubérculo



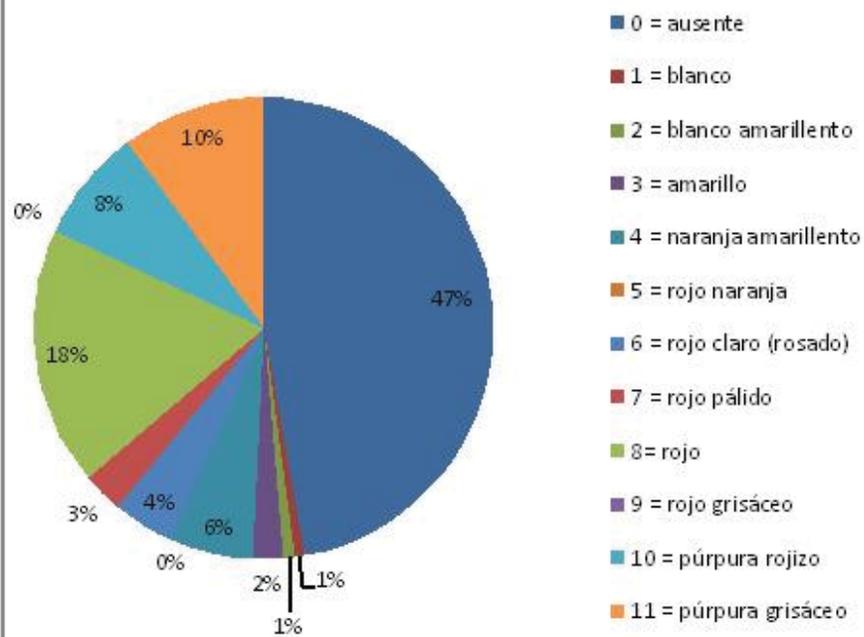
Distribución del color secundario de la superficie de los tubérculos



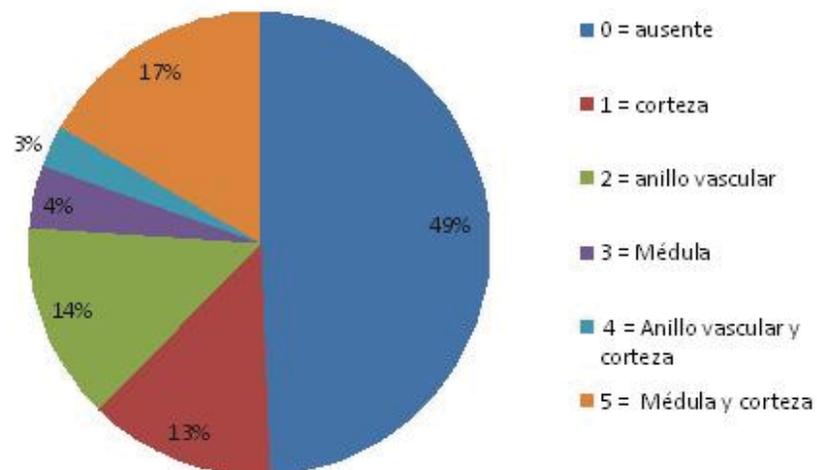
Color predominante de la pulpa



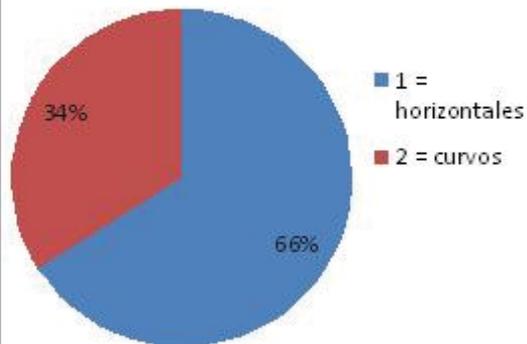
Color secundario de la pulpa



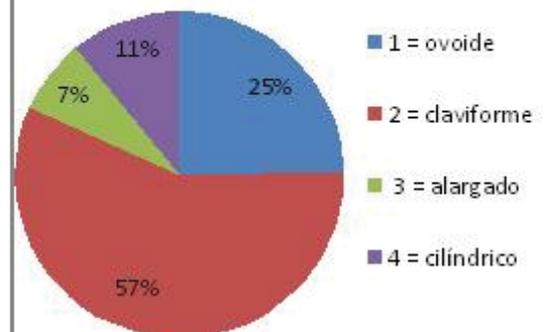
Distribución del color secundario de la pulpa



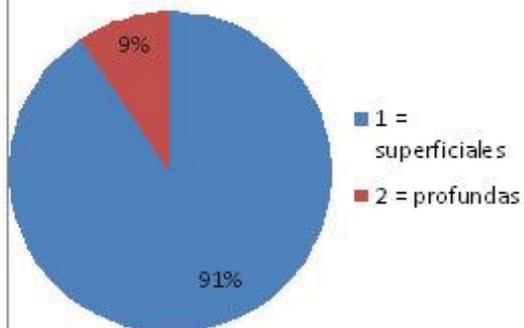
Forma de yemas



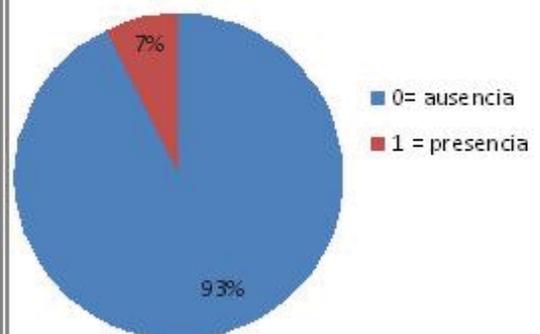
Forma de los tubérculos



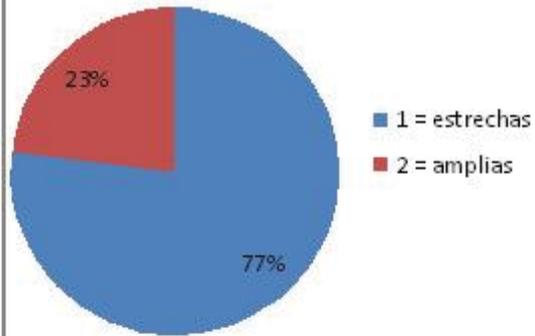
Profundidad de yemas



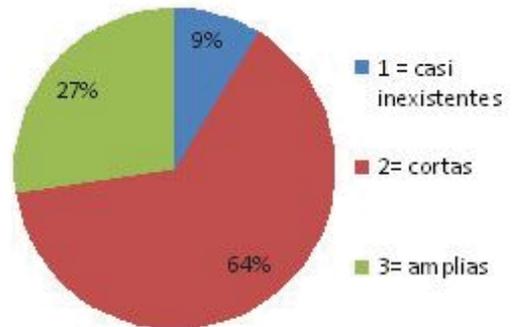
Intensidad de Fasciación



Ancho de brácteas



Largo de brácteas



Presencia de quimeras

